

M/ Tesis/ 2748

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**SEÑALIZACIÓN POR GLUCOSA EN *Saccharomyces cerevisiae*. PAPEL DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE LIGAN GLUCOSA, DE ENZIMAS QUE LA FOSFORILAN Y DE METABOLITOS INTRACELULARES.**

Memoria que para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid presenta la Licenciada en Biología

**Mónica Martín Belinchón**

Directora:

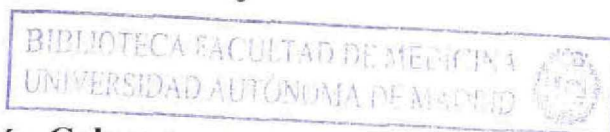
**Dra. Juana María Sempere Couderc**

Profesora de Investigación del C.S.I.C.

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" C.S.I.C.-U.A.M.

Reg. F.M. 24.566

Tutora:

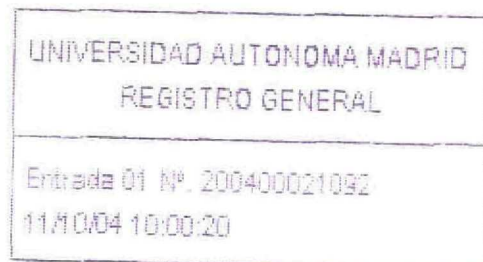


**Dra. María Jesús Mazón Calpena**

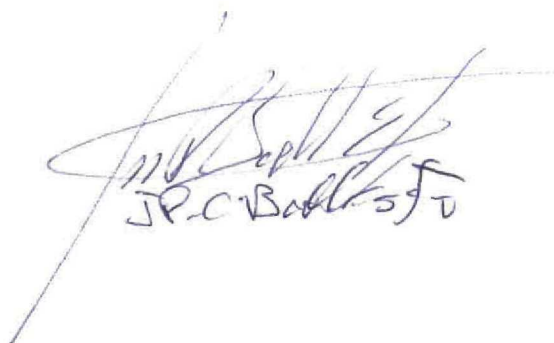
Investigadora Científica

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" C.S.I.C.-U.A.M.

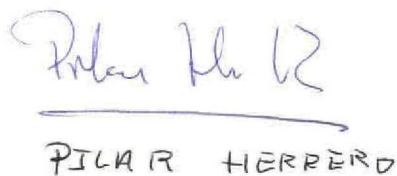
Madrid, 2004



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la  
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral  
con la censura de SOBRESALIENTE "CUM LAUDE" POR UNANIMIDAD  
Madrid, 25 NOVIEMBRE 2004



J.P.C. BALLESTER



PILAR HERRERO



I. CERDÁN



PILAR ERASO.

Antón Jiller  
ANTONIO JILLER




Juana María Gancedo Sempere, Profesora de Investigación del C.S.I.C., adscrita al Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols",

DECLARA:

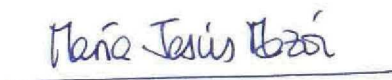
Que el trabajo titulado "SEÑALIZACIÓN POR GLUCOSA EN *Saccharomyces cerevisiae*. PAPEL DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA, DE ENZIMAS QUE LA FOSFORILAN Y DE METABOLITOS INTRACELULARES." presentado por la Licenciada en Biología Mónica MARTÍN BELINCHÓN para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" del C.S.I.C.-UAM. Las contribuciones presentadas son producto de trabajo original desarrollado por la candidata.

Que visto y revisado el texto de la memoria, no tiene inconveniente alguno en su presentación para que sea defendido en lectura pública de acuerdo con la normativa vigente.

Y para que así conste donde proceda, firma la presente en Madrid, a 30 de Septiembre del 2004.



Juana María Sempere Couderc  
Profesora de Investigación del C.S.I.C.  
Nº de funcionario 0077197735A5402



María Jesús Mazón Calpena  
Profesora Honoraria. Dept. Bioquímica  
Nº de funcionario 5040323146A5403

*A mi abuela Paca  
y a mi abuelo Joaquín*

"...But in the real world, it's very hard to know which problems are important, and you never know whether at a given moment in history a problem is solvable." Steven Weinberg, 2003.

".. But none of these pleasures, great and satisfying though they are, match the joy of discovery." Tim Hunt, 2001.

ABREVIATURAS.....	1
1. RESUMEN / SUMMARY.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
4.1. Material biológico.....	15
4.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	16
4.2.1. Medios de cultivo para levaduras.....	16
4.2.2. Medios de cultivo para bacterias.....	17
4.2.3. Condiciones de crecimiento para levaduras.....	17
4.3. Técnicas bioquímicas.....	18
4.3.1. Preparación de extractos celulares.....	18
4.3.2. Valoraciones enzimáticas.....	19
4.3.3. Recogida de muestras para la valoración de metabolitos intracelulares.....	20
4.3.4. Valoración de la concentración de metabolitos intracelulares.....	20
4.3.5. Valoración de la concentración de xilosa.....	21
4.3.6. Valoración de la concentración de xilitol.....	21
4.3.7. Inactivación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa.....	21
4.3.8. Desrepresión de la piruvato descarboxilasa.....	21
4.4. Técnicas de genética clásica.....	22
4.5. Técnicas de biología molecular.....	22
4.5.1. Plásmidos utilizados.....	22
4.5.2. Métodos de transformación celular.....	23
4.5.3. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	23
4.5.4. Obtención de DNA genómico de levadura.....	24
4.5.5. Análisis de DNA genómico por el método de Southern.....	24
4.5.6. Obtención de RNA total de levadura y análisis de northern...	24
4.5.7. Análisis de western.....	26
5. RESULTADOS.....	28

5.1. Efecto de la falta de los sensores de membrana en diferentes procesos desencadenados por la glucosa.....	28
5.1.1. Represión a corto y largo plazo de diversas enzimas.....	28
5.1.2. Inducción y represión de la invertasa.....	30
5.1.3. Inducción de la piruvato descarboxilasa.....	32
5.1.4. Inducción del transportador de glucosa <i>HXT1</i> .....	33
5.1.5. Inactivación de la FbPasa.....	34
5.1.6. Activación de la ATPasa de membrana.....	34
5.2. Efecto de la ausencia de enzimas fosforilantes en diferentes procesos desencadenados por la glucosa.....	35
5.2.1. Represión de diferentes enzimas durante el crecimiento.....	36
5.2.2. Cinética de desrepresión de diferentes enzimas.....	38
5.2.3. Inducción y represión de la invertasa.....	39
5.2.4. Inducción de la piruvato descarboxilasa.....	41
5.2.5. Inducción del transportador de glucosa <i>HXT1</i> .....	43
5.2.6. Inactivación de la FbPasa.....	43
5.2.7. Activación de la ATPasa de membrana.....	45
5.3. Efecto de distintas fuentes de carbono no fermentables sobre la expresión de diversos genes sujetos a represión catabólica.....	46
5.3.1. Desrepresión de las enzimas gluconeogénicas, glutámico deshidrogenasa, galactoquinasa e invertasa.....	46
5.3.2. Niveles de actividad durante el crecimiento.....	50
5.3.3. Falta de correlación entre represión de la FbPasa y niveles intracelulares de hexosas fosfato.....	53
6. DISCUSIÓN.....	54
7. CONCLUSIONES.....	64
8. BIBLIOGRAFIA.....	65
9. ANEXO I: La recogida de muestras de levadura por filtración incrementa el rendimiento de los mRNAs en <i>S. cerevisiae</i> .....	81
10. ANEXO II: PUBLICACIONES.....	92



*Ahora que he terminado este trabajo quiero dedicar unas líneas a todos aquellos que no dudaron un instante en prestarme su ayuda y su apoyo durante todos estos años, y sin los cuales seguro que no lo hubiera conseguido.*

*En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Juana M<sup>a</sup> Gancedo el haberme dado esta oportunidad. Por haber dirigido mi tesis. Por enseñarme, ayudarme y estar siempre pendiente de todos mis progresos. Por intentar hacerme comprender todas sus excelentes ideas de la forma más sencilla.*

*Y al Dr. Carlos Gancedo por ser un ejemplo científico a seguir para mí. Y por estar dispuesto a ofrecermé todas sus críticas interesantes tanto de esta tesis como del resto de mi trabajo durante estos años, así como su apoyo sincero.*

*A la Dra. Lisset Flores, por todo lo que he aprendido con ella, por toda su paciencia y dedicación a este trabajo que tanto nos llena. Por ser más que compañera, mi amiga, por estar conmigo día tras día, escuchando y aconsejándome, compartiendo alegrías y tristezas, ilusiones y proyectos...por más momentos como los que hemos vivido juntas, y siempre. Gracias chiqui. Y gracias José. Os quiero mucho.*

*A Jose Antonio, por tantas horas de móvil, por tantos abrazos de los grandes cuando más me hacían falta, por estar siempre ahí, y porque a pesar de que eres un poco cascarrabias sé que me quieres un montón. Gracias josito. Y un beso para la Antoñita.*

*A Raquel Jardón, por querer escucharme tantas veces mis dilemas (que han sido muchos verdad??), por tantas horas juntas "haciendo ciencia" y por esas risas al final de cada tarde. Gracias Rákel.*

*Al Dr. Eduardo Silles ("el Edu") que tanto antes, durante y después de que compartieramos mesa y poyata siempre ha estado dispuesto a echarme una mano y a escucharme, por sus consejos y amistad. Gracias Edu, y gracias Hugo.*



*A la Dra. Eugenia Costamagna, por nuestros huequitos de cháchara (incluso en inglés!!), por tus consejos científicos y por demostrarme que puedo contar contigo. Gracias Euge.*

*Al resto de "los aserejés" (los de siempre y los de ahora): Bibi, Miguel, Christian, Garci, Enrique, Pablo..., por tan buenos ratos y risas que han hecho que hasta los malos momentos merecieran la pena,*

*A Bea, por esas tardes de domingo en el VIP'S intentando "comprenderlos" (qué difícil!!), defendiendo el romanticismo... Ah! Y por nuestro "chat de novedades". Muchas gracias niña por esos ratitos.*

*También quiero agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Mazón por ser la tutora de mi tesis, por su interés y por estar dispuesta a ayudarme en todo momento.*

*Y a mi Lucas, por recibir todos mis besos y mimos, por tus caritas y travesuras, por tu compañía en tantos momentos difíciles, qué haría yo sin ti, mi Lucky!!.*

*Por último quiero dar las gracias también a aquellos que con su trabajo y amistad han formado parte de esta tesis, gracias a M<sup>a</sup> Carmen de secretaria, a Gabriel, a los de fotografía, a los de bioinformática...a todos.*

*A la Dirección General de Investigación Científica y Técnica por financiarme económicamente este trabajo con una beca de la EU BIO-HUG QLK3-CT-1999-00080 y una beca asociada al proyecto BMC 2001-1690-CO2-01.*

*Muchas gracias a todos, de corazón.*

*ABREVIATURAS.*

*ACT1*: Gen que codifica la actina.

D.O.: densidad óptica.

*FBP1*: Gen que codifica la fructosa-1,6-bisfosfatasa.

FbPasa: Fructosa-1,6-bisfosfatasa.

*GDH2*: Gen que codifica la glutámico deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>.

GlutDH: Glutámico deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>.

*GLK1*: Gen que codifica la glucoquinasa 1.

Glk1: Glucoquinasa 1.

*GPR1*: Gen que codifica el receptor de membrana Gpr1.

*HXK1*: Gen que codifica la hexoquinasa 1.

Hxk1: Hexoquinasa 1.

*HXK2*: Gen que codifica la hexoquinasa 2.

Hxk2: Hexoquinasa 2.

*HXT1*: Gen que codifica el transportador de glucosa 1.

Hxt1: Transportador de glucosa 1.

*ICL1*: Gen que codifica la isocitrato liasa.

ICL: Isocitrato liasa.

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranósido.

kDa. Kilodalton.

*lacZ*: Gen que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.

*PDC*: Gen que codifica la piruvato descarboxilasa.

Pdc: Piruvato descarboxilasa.

*RGT2*: Gen que codifica la proteína sensora Rgt2.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

*SNF3*: Gen que codifica la proteína sensora Snf3.

*SUC2*: Gen que codifica la invertasa.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-galactopiranósido.

## *1. RESUMEN/SUMMARY.*

La presencia de glucosa en el medio provoca múltiples cambios en el metabolismo de la levadura y esto plantea la pregunta de si estas modificaciones responden a una señal única o si se deben a señales alternativas. Para abordar esta cuestión se ha estudiado cómo afecta a diferentes procesos desencadenados por la glucosa la ausencia de dos posibles elementos iniciales en la vía de señalización: los sensores de glucosa de la membrana plasmática (Snf3, Rgt2 y Gpr1) y las enzimas capaces de fosforilar la glucosa e iniciar su metabolismo (Hxk1, Hxk2 y Glk1).

Nuestros resultados indican que Snf3/Rgt2 y Gpr1 tienen un efecto moderado y aditivo sobre la inducción de *SUC2* por baja glucosa y sobre la inactivación irreversible de la FbPasa. Por el contrario siempre que la levadura transporte bien la glucosa, los sensores no se requieren para la represión catabólica ni para la activación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática. Mientras que Snf3/Rgt2 se requiere para la inducción del gen *HXT1* por glucosa alta, la ausencia de Gpr1 no afecta al proceso.

Por otro lado hemos comprobado que la fosforilación de la glucosa es absolutamente necesaria para que se produzca represión catabólica. En el caso de enzimas gluconeogénicas cualquiera de las quinasas capaces de fosforilar glucosa permite total represión, en otros casos la represión es total con Hxk2 pero sólo parcial o nula con Hxk1 o Glk1. En ausencia de enzimas que fosforilan la glucosa no se induce la piruvato descarboxilasa, pero hay cierto grado de inducción de *HXT1-lacZ* y una fuerte inducción de *SUC2* que requiere una elevada concentración de glucosa. Por último cualquier enzima que fosforile la glucosa permite la inactivación de la FbPasa.

También se ha analizado la capacidad de diferentes fuentes de carbono no fermentables para producir represión catabólica en *S. cerevisiae*. A corto plazo la xilosa bloquea totalmente la desrepresión de genes que codifican enzimas gluconeogénicas y disminuye la expresión de otras enzimas investigadas. La glicerina y la dihidroxiacetona tienen unos efectos menos marcados. En experimentos a largo plazo el efecto represor de la xilosa es menor. No se ha encontrado una correlación entre el grado de represión de la FbPasa y los niveles intracelulares de algunos intermediarios glicolíticos como la glucosa-6-P y la fructosa-1,6-bisfosfato.



The presence of glucose in the medium causes multiple changes in the metabolism of yeast and this raises a question: do all these modifications occur in response to a single signal or are they due to alternative signals. To approach this problem we have studied how different processes triggered by glucose are affected by the absence of two possible early elements in the signaling pathway: sensors of glucose in the plasma membrane (Snf3, Rgt2 and Gpr1) and enzymes able to phosphorylate glucose and to initiate its metabolism (Hxk1, Hxk2 and Glk1).

Our results indicate that Snf3/Rgt2 and Gpr1 have an effect moderate and additive on the induction of *SUC2* by low glucose and on the irreversible inactivation of FbPase. In contrast, as long as, glucose is efficiently taken up by the yeast, the glucose sensors are not needed for catabolite repression or for activation of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase. Whereas Snf3/Rgt2 is needed for induction of *HXT1* gene by high glucose, the absence of Gpr1 does not affect the process.

We have also checked that glucose phosphorylation is absolutely necessary for catabolite repression to take place. In the case of the gluconeogenic enzymes, any kinase able to phosphorylate glucose allows total repression, in other cases repression is total with Hxk2 but only partial or absent with Hxk1 or Glk1. In the absence of enzymes able to phosphorylate glucose pyruvate decarboxylase is not induced, but there is a certain degree of induction of *HXT1-lacZ* and a strong induction of *SUC2* which requires a high concentration of glucose. Finally any enzyme able to phosphorylate glucose allows inactivation of FbPase.

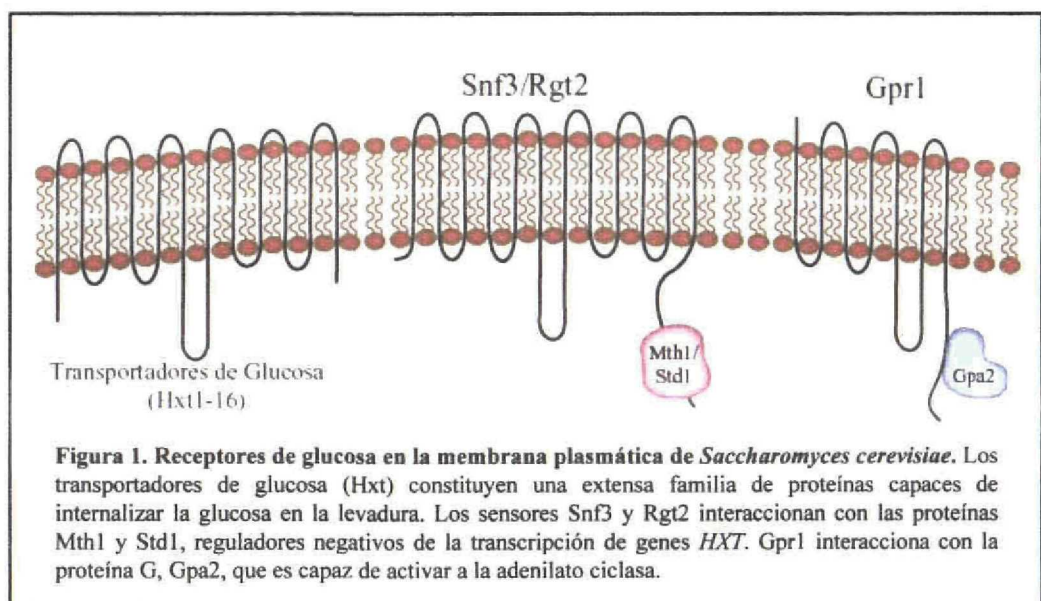
We have also examined the capacity of different non fermentable carbon sources to cause catabolite repression in *S. cerevisiae*. In the short term xylose completely blocks the desrepression of genes encoding gluconeogenic enzymes and decreases levels of expression of other enzymes investigated. Glycerol and dihydroxyacetone have a less marked effect. In long-term experiments the repressor effect of xylose is smaller. We have not found a correlation between the degree of repression of FbPase and the intracellular levels of glycolytic intermediates such as glucose-6-P and fructose-1,6-bisphosphate.



La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo de gran importancia tanto en ciencia básica como aplicada. Es bien conocida su función en la elaboración del vino, la cerveza y el pan, productos que en las civilizaciones mediterráneas han tenido una gran importancia económica y relevancia cultural. Seguramente *S. cerevisiae* está entre los primeros microorganismos utilizados por el hombre pero es en el campo de la investigación, donde gracias a su análisis bioquímico y genético, se ha convertido en una herramienta de primer orden para el estudio de la biología de los eucariotas. Las investigaciones realizadas con esta levadura no sólo han producido resultados que han sido útiles para entender numerosos procesos en una gran variedad de organismos sino que han dado lugar a importantes avances tecnológicos. En particular la levadura se ha usado como banco de pruebas para poner a punto procedimientos para llevar a cabo la secuenciación de un genoma completo o para medir de forma simultánea niveles de transcripción de un gran número de genes.

Como todos los seres vivos las levaduras deben adaptarse a un medio cambiante, en el que la disponibilidad de nutrientes puede experimentar grandes variaciones. Esto ha llevado a que en la levadura, a lo largo de la evolución, se hayan seleccionado diferentes estrategias para poder adaptarse a estas variaciones. En particular *S. cerevisiae* modifica profundamente su metabolismo y expresión génica y como resultado su crecimiento en respuesta a la disponibilidad de fuentes de carbono en el medio. El presente trabajo está centrado en el estudio de la respuesta de la levadura *S. cerevisiae* a la presencia de glucosa en el medio.

*S. cerevisiae* utiliza preferentemente la glucosa de entre todos los azúcares y cuando hay glucosa en el medio, el metabolismo de la célula se modifica de modo que pueda metabolizarse de forma óptima. Entre las modificaciones producidas se puede destacar: la activación de determinadas enzimas como las protein quinasas dependientes de cAMP (Mazón, M. *et al.*, 1982, Thevelein, J., 1994) o la ATPasa de membrana plasmática (Serrano, R., 1983), la inactivación de otras como las enzimas gluconeogénicas (inactivación catabólica) (Gancedo, J. M. y Gancedo, C., 1997) y sobre todo una profunda reorganización del patrón de transcripción con inducción de una serie de genes (Özcan, S. y Johnston, M., 1995, Boles, E. *et al.*, 1996) y represión





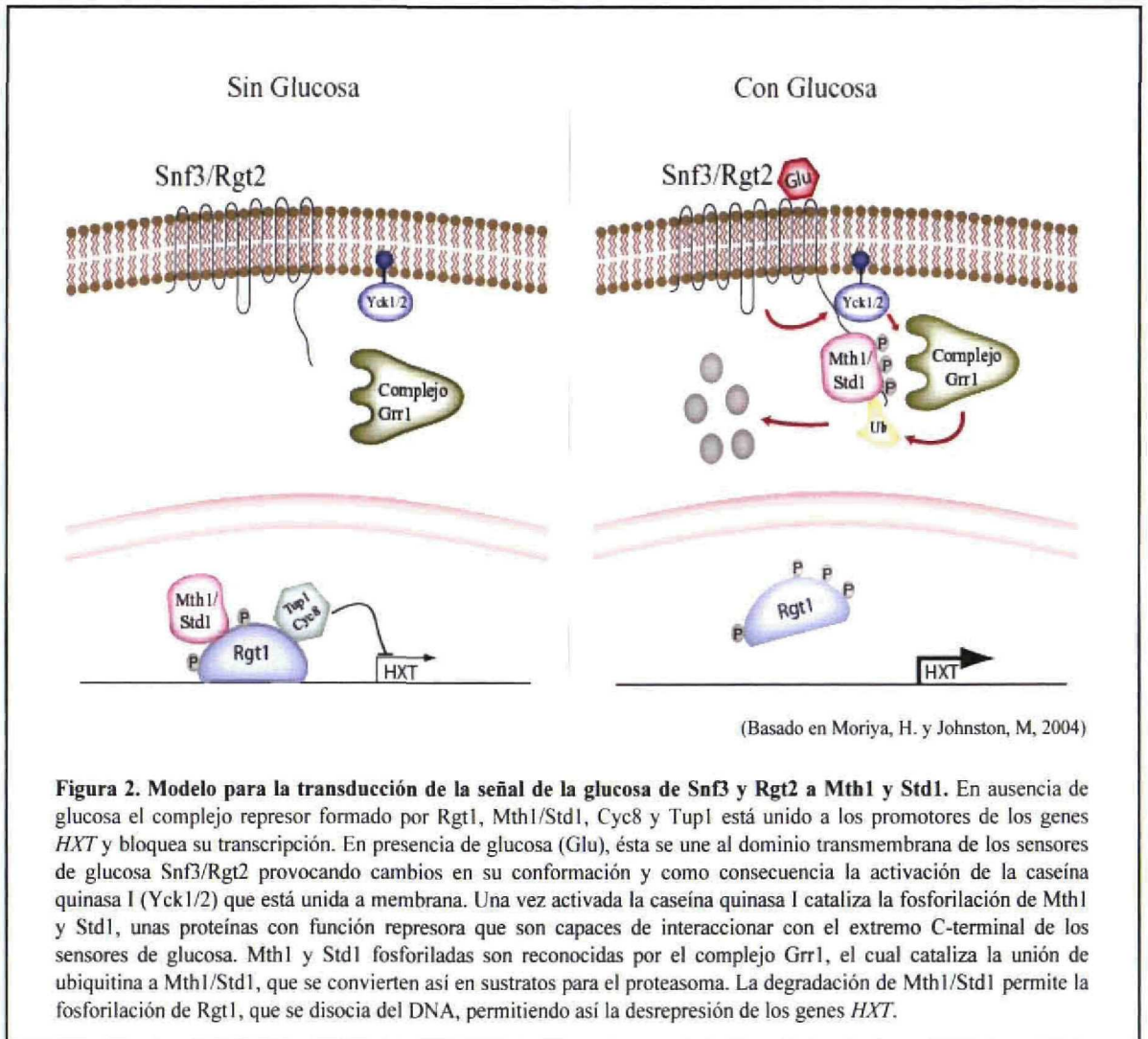
de otros muchos (represión catabólica por glucosa) (Gancedo, J. M., 1998, Carlson, M., 1999, Johnston, M., 1999, Schüller, H. J., 2003).

Todos estos cambios deben implicar una cadena de procesos en la que el paso inicial es una “señal” producida por la presencia de glucosa. Se conocen ya numerosos elementos que participan en las etapas posteriores de la transmisión de la señal y que son diferentes para distintos procesos. En cambio, no está claro si existe una única señal inicial para todos ellos o si distintos procesos responden a señales alternativas (Rolland, F. *et al.*, 2001, Kaniak, A. *et al.*, 2004).

Uno de los mecanismos de señalización más conservados, desde bacterias a mamíferos, tiene como etapa inicial la interacción de un nutriente (o una hormona) con una proteína de membrana. Esta interacción a su vez, provoca una cascada de reacciones de fosforilación que, en último término, afecta a la expresión, localización y/o actividad de diversas proteínas. Entre ellas resultan especialmente importantes factores de transcripción que tienen como blanco los promotores de los genes que codifican las enzimas afectadas por el estímulo inicial.

En la membrana plasmática de *S.cerevisiae* se han descrito distintos tipos de proteínas capaces de interaccionar con la glucosa y que podrían iniciar una vía de señalización (fig. 1). Existe una familia de transportadores de glucosa (Hxt) con más de 10 miembros, que poseen 12 dominios transmembrana y se distinguen por su afinidad para la glucosa y su capacidad de transporte. Los principales de estos transportadores son Hxt1 y Hxt3 que tienen baja actividad y alta capacidad y Hxt2, Hxt4, y Hxt7 que presentan alta afinidad y baja capacidad (Boles, E. y Hollenberg, C. P., 1997). La represión catabólica sólo se produce si la glucosa puede entrar en la célula y metabolizarse, pero no parece que ningún transportador desempeñe un papel específico en el proceso (Reifenberger, E. *et al.*, 1997).

Se encuentran además en la membrana plasmática las proteínas Snf3 y Rgt2, unos homólogos de los transportadores de glucosa, que no actúan como permeasas (Özcan, S. *et al.*, 1998) sino que desempeñan un papel regulador (Özcan, S. *et al.*, 1996, Özcan, S. *et al.*, 1997, Özcan, S. *et al.*, 1998). La presencia de glucosa en el medio es detectada por *S. cerevisiae* a través de los sensores Snf3 y Rgt2 y hay evidencia de que las colas citoplasmáticas de estos sensores juegan un papel



**Figura 2. Modelo para la transducción de la señal de la glucosa de Snf3 y Rgt2 a Mth1 y Std1.** En ausencia de glucosa el complejo represor formado por Rgt1, Mth1/Std1, Cyc8 y Tup1 está unido a los promotores de los genes *HXT* y bloquea su transcripción. En presencia de glucosa (Glu), ésta se une al dominio transmembrana de los sensores de glucosa Snf3/Rgt2 provocando cambios en su conformación y como consecuencia la activación de la caseína quinasa I (Yck1/2) que está unida a membrana. Una vez activada la caseína quinasa I cataliza la fosforilación de Mth1 y Std1, unas proteínas con función represora que son capaces de interaccionar con el extremo C-terminal de los sensores de glucosa. Mth1 y Std1 fosforiladas son reconocidas por el complejo Grr1, el cual cataliza la unión de ubiquitina a Mth1/Std1, que se convierten así en sustratos para el proteasoma. La degradación de Mth1/Std1 permite la fosforilación de Rgt1, que se disocia del DNA, permitiendo así la desrepresión de los genes *HXT*.



importante en la transducción de la señal de “presencia de glucosa” al interior celular. La transducción implica una interacción de Snf3 y Rgt2 con dos proteínas, Mth1 y Std1, que controlan la transcripción de los transportadores de glucosa (Schmidt, M. C. *et al.*, 1999, Lafuente, M. J. *et al.*, 2000). Recientemente se ha propuesto un modelo de señalización en el que estaría también implicada una proteína quinasa asociada a membrana, la caseína quinasa I (Yck1) (Moriya, H. y Johnston, M., 2004) (fig. 2). La glucosa, al unirse a los sensores, causaría la activación de Yck1 en la membrana celular que fosforilaría a Mth1 y Std1, desencadenando así su ubiquitinación catalizada por el complejo multiprotéico SCF<sup>Grr1</sup> y su posterior degradación. Al no estar presentes Mth1 o Std1 la proteína represora Rgt1 puede fosforilarse, con lo que deja de interaccionar con los promotores de los genes *HXT* y puede producirse la transcripción de los genes que codifican los transportadores de glucosa (Flick, K. M. *et al.*, 2003, Lakshmanan, J. *et al.*, 2003) (fig. 2). Mientras que la proteína Snf3 es requerida para la inducción a bajos niveles de glucosa de algunos genes como *HXT2* o *HXT3*, Rgt2 participa en la inducción a altas concentraciones de glucosa de otros genes tales como *HXT1* (Özcan, S. *et al.*, 1996). Aunque en un doble mutante *snf3 rgt2* no se produce represión catabólica (Özcan, S. *et al.*, 1998), esto parece debido a la baja capacidad de esa levadura para transportar glucosa. En efecto, en el triple mutante *snf3 rgt2 mth1*, que carece del regulador negativo Mth1, y expresa transportadores de glucosa, la represión catabólica es normal (Lafuente, M. J. *et al.*, 2000).

Por último, se ha identificado en la membrana el receptor Gpr1, con siete dominios transmembrana, que está acoplado a una proteína G, Gpa2 (Yun, C. W. *et al.*, 1998, Rolland, F. *et al.*, 2000). Cuando una célula de levadura pasa de un medio sin glucosa a un medio que contiene este azúcar, la glucosa se une al receptor Gpr1 que interacciona con Gpa2 y permite así la activación de la adenilato ciclasa provocando un aumento transitorio en la concentración intracelular de cAMP (Rolland, F. *et al.*, 2000). En una cepa carente de Gpr1 el nivel de cAMP aumenta sólo ligeramente en respuesta a la glucosa.

Una vez dentro de la célula, la glucosa se liga a alguna de las quinasas capaces de fosforilarla, iniciando así su metabolismo. Estas enzimas, las hexoquinasas 1 y 2 y la glucoquinasa (Hxk1, Hxk2 y Glk1) (Lobo, Z. y Maitra, P. K., 1977), podrían participar

en la vía de señalización de glucosa de dos maneras: como sensores intracelulares que a su vez interaccionarían con otras proteínas o incluso con el DNA, o dando origen a cambios en la concentración de metabolitos intracelulares como consecuencia del metabolismo de la glucosa.

Hay cierta evidencia de que la Hxk2 funciona como sensor. Durante el crecimiento en glucosa *HXK2* tiene una alta expresión, mientras que los genes *HXK1* y *GLK1* están reprimidos (Herrero, P. *et al.*, 1995) y está bien establecido que la ausencia de Hxk2 permite la desrepresión de algunos genes tales como *SUC2* aunque se encuentre una elevada concentración de glucosa en el medio y estén presentes Hxk1 y/o Glk1. Sin embargo otros genes como los que codifican enzimas gluconeogénicas no se desreprimen en un mutante *hxx2* en presencia del azúcar (Gancedo, J. M., 1998). En presencia de glucosa una parte de la proteína Hxk2 que normalmente reside en el citosol es translocada al núcleo. Esta translocación depende de un decapeptido interno entre los residuos 7 y 16 de la hexoquinasa 2, y si éste no está presente, aunque la actividad catalítica de la hexokinasa no se encuentra afectada, no se produce represión catabólica de *SUC2* (Herrero, P. *et al.*, 1998). Se ha mostrado que Hxk2 interacciona con la proteína Mig1, un represor transcripcional, y que Mig1 se requiere para que Hxk2 pueda permanecer en el núcleo (Ahuatzi, D. *et al.*, 2004).

Aunque en algún momento se propuso que la proteína Tps1 (trehalosa-6P sintasa) podría jugar un papel en el proceso de señalización por glucosa (Van Aelst, L. *et al.*, 1993) se ha podido mostrar que Tps1 no era necesaria para la represión de diversos genes ni para que se llevaran a cabo otros procesos inducidos por glucosa (Rodríguez, C. y Gancedo, J. M., 1999).

Se ha comprobado que tanto la represión catabólica como la inducción de algunos genes por glucosa requieren al menos un metabolismo parcial de la misma (Rose, M. *et al.*, 1991, Boles, E. y Zimmermann, F. K., 1993). Por ello se ha sugerido que cambios en la concentración de algún metabolito o metabolitos intracelulares podrían desempeñar un papel importante en el control de la expresión de genes sujetos a represión por glucosa, pero no se ha identificado todavía ningún potencial metabolito regulador. Aunque el cAMP participe en la represión por glucosa del gen *FBP1* que codifica la FbPasa, parece que este elemento es redundante con otros mecanismos

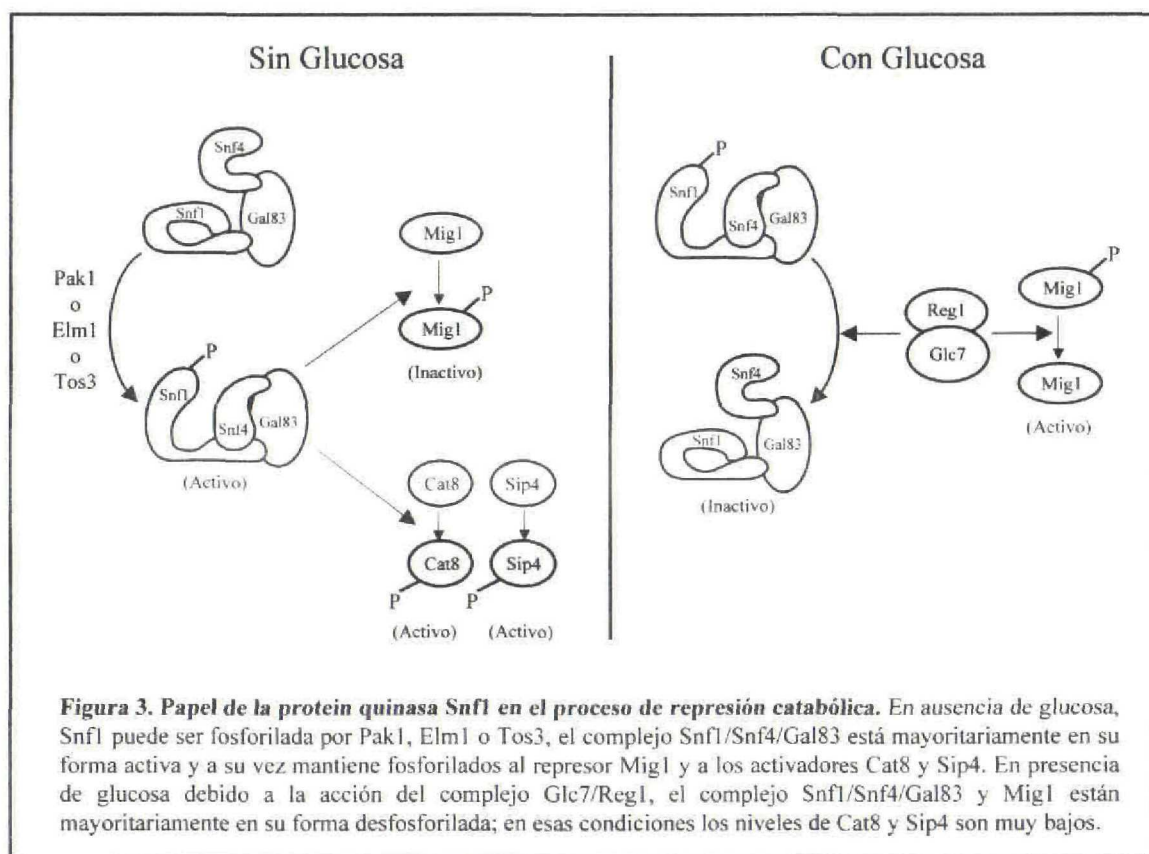


reguladores (Zaragoza, O. *et al.*, 1999, Zaragoza, O. y Gancedo, J. M., 2001). Se ha propuesto como posible molécula reguladora la glucosa-6-P (Gancedo, J. M., 1998), (Vincent, O. *et al.*, 2001) y la gran diferencia en las concentraciones intracelulares de fructosa-1,6-bisfosfato entre las condiciones de glicolisis y gluconeogénesis podría sugerir a este metabolito como una señal intracelular de la presencia de glucosa en el medio. Sin embargo las diferencias en el patrón de metabolitos intracelulares entre levaduras creciendo en glucosa o en una fuente de carbono no represora son tan numerosas que no permiten apuntar al compuesto(s) que podría(n) actuar como señal(es).

Si se pudiera establecer una correlación entre el grado de represión y la concentración de determinados metabolitos se habría dado un primer paso en la búsqueda del metabolito o los metabolitos reguladores. Se conoce actualmente que no sólo la glucosa es capaz de producir represión catabólica, sino que otras fuentes de carbono fermentables tales como la galactosa, maltosa o sacarosa pueden disminuir la transcripción de una gran variedad de genes. El disponer además de diversas fuentes de carbono no fermentables, que utilizaran distintas vías metabólicas y causaran diferentes grados de represión catabólica, permitiría investigar la relación entre el grado de represión y la concentración de metabolitos a la que se hacía referencia anteriormente.

En lo que precede hemos considerado los distintos elementos que podrían actuar como señal inicial de la presencia de glucosa. A continuación vamos a examinar brevemente lo que se conoce sobre el desarrollo de los distintos tipos de procesos desencadenados por la glucosa en la levadura.

En presencia de glucosa, el funcionamiento de numerosas enzimas involucradas en el metabolismo de otras fuentes de carbono es innecesario. Por ello se desencadena un proceso de represión génica que evita una inversión de energía y materiales en la síntesis de los mRNAs y las enzimas correspondientes. Se sabe desde hace tiempo que una proteína central en el mecanismo de represión por glucosa en *S. cerevisiae* es la protein quinasa Snf1, la cual está asociada a otras proteínas (Snf4 y Sip1, Sip2 o Gal 83) formando un complejo (Celenza, J. L. y Carlson, M., 1986) (fig. 3). En ausencia de glucosa, Snf1 sufre una fosforilación que la activa (Jiang, R. y Carlson, M., 1996) el



**Figura 3. Papel de la protein quinasa Snf1 en el proceso de represión catabólica.** En ausencia de glucosa, Snf1 puede ser fosforilada por Pak1, Elm1 o Tos3, el complejo Snf1/Snf4/Gal83 está mayoritariamente en su forma activa y a su vez mantiene fosforilados al represor Mig1 y a los activadores Cat8 y Sip4. En presencia de glucosa debido a la acción del complejo Glc7/Reg1, el complejo Snf1/Snf4/Gal83 y Mig1 están mayoritariamente en su forma desfosforilada; en esas condiciones los niveles de Cat8 y Sip4 son muy bajos.



complejo en el que participa Gal83 pasa al núcleo (Vincent, O. *et al.*, 2001) y allí activa factores de transcripción como Cat8 o Sip4 e inactiva un represor como Mig1. Cuando la glucosa está presente en el medio, Snf1 se desfosforila, no es activa y los genes reprimidos por glucosa dejan de transcribirse (fig. 3).

Además del complejo de la proteína quinasa Snf1, el represor de la transcripción Mig1 y el complejo Glc7-Reg1 también desempeñan un papel importante en la represión. Mig1 es una proteína que se une al DNA y reprime la transcripción de muchos genes en presencia de glucosa (Nehlin, J. O. y Ronne, H., 1990). La función de Mig1 es regulada por fosforilación de manera que cuando existe glucosa en el medio la proteína no está fosforilada, se encuentra en el núcleo y es activa (Treitel, M. A. *et al.*, 1998); en ausencia de glucosa Mig1 es fosforilada por Snf1, se inactiva y pasa al citoplasma (Smith, F. C. *et al.*, 1999). Hay evidencia reciente de que la fosforilación de Mig1 no bloquea su unión al DNA, pero impide su interacción con los corepresores Cyc8 y Tup1 (Papamichos-Chronakis, M. *et al.*, 2004). La desfosforilación tanto de Snf1 como de Mig1 parece ser llevada a cabo por el complejo formado por la proteína fosfatasa Glc7 y la proteína reguladora Reg1 que facilita la represión catabólica permitiendo la unión de Glc7 a Snf1 (Tu, J. y Carlson, M., 1995). Recientemente se han identificado 3 proteínas quinasas, Elm1, Pak1 y Tos3, que son capaces de fosforilar a Snf1 y que parecen tener funciones parcialmente redundantes (Hong, S. P. *et al.*, 2003, Nath, N. *et al.*, 2003, Sutherland, C. M. *et al.*, 2003). Sin embargo no se ha averiguado todavía qué señal(es) controla(n) el estado de fosforilación y la localización intracelular de Snf1.

Hay que hacer notar que la glucosa no sólo disminuye la síntesis de diversas enzimas actuando a nivel transcripcional sino que en algunos casos también aumenta la velocidad de degradación de los mRNAs de los genes correspondientes. Esto se ha observado para genes como *SDH2* (Lombardo, A. *et al.*, 1992, De La Cruz, B. J. *et al.*, 2002), *PCK1* (Mercado, J. J. *et al.*, 1994, Yin, Z. *et al.*, 2000) o *SUC2* (Cereghino, G. P. y Scheffler, I. E., 1996). La regulación por glucosa a nivel post-transcripcional podría compartir elementos de control con el sistema de regulación de la transcripción. Por ejemplo se ha visto que la proteína Reg1 se requería para la degradación del mRNA de *SUC2* (Cereghino, G. P. y Scheffler, I. E., 1996) y parecen relevantes en el

proceso de degradación de mensajeros la vía de señalización Ras-cAMP, las kinasas capaces de fosforilar la glucosa y el sensor de membrana para dicho azúcar Snf3 (Yin, Z. *et al.*, 2000).

Mientras que la glucosa provoca la represión de la transcripción de un gran número de genes implicados en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas, también promueve la transcripción de diversos genes que codifican proteínas necesarias para la utilización de este azúcar, como pueden ser los transportadores de glucosa, Hxt, (Özcan, S. y Johnston, M., 1995, Özcan, S. y Johnston, M., 1996) o la enzima piruvato descarboxilasa (Schmitt, H. D. *et al.*, 1983) y también genes requeridos para un crecimiento rápido como los que codifican las proteínas ribosomales (Warner, J. R., 1989).

Ya hemos comentado anteriormente que la transcripción de los genes *HXT* está regulada a través de la vía de los sensores de glucosa Snf3 y Rgt2. También la *Hxk2* parece jugar algún papel en la inducción por glucosa ya que en mutantes *hxk2* el nivel de expresión de los genes *HXT2*, *HXT3* y *HXT4* a baja concentración de glucosa es menor que en la cepa silvestre, y a alta concentración de glucosa *HXT1* solo se desreprime parcialmente (Özcan, S. y Johnston, M., 1995). Existe por otra parte evidencia de que en un mutante *hxt* nulo (carente de los seis primeros transportadores de glucosa identificados, *HXT1-HXT6*) la inducción de *HXT1* a altas concentraciones de glucosa es normal (Özcan, S., 2002). A pesar de ello no se puede afirmar que no se requiera la internalización de la glucosa y un metabolismo parcial de la misma para la inducción de *HXT1* ya que el mutante utilizado es capaz de crecer lentamente en glucosa y por lo tanto debe expresar transportadores de glucosa alternativos.

La piruvato descarboxilasa cataliza la degradación del producto final de la glicólisis, el piruvato, a acetaldehído y CO<sub>2</sub>. En *S. cerevisiae* se han descrito tres isoenzimas codificadas por los genes *PDC1*, *PDC5* y *PDC6* pero en una cepa silvestre sólo se expresa significativamente *PDC1* ((Hohmann, S., 1991, Hohmann, S., 1993). La actividad de la Pdc en cepas silvestres creciendo en etanol es bastante baja pero puede aumentar de 5-10 veces tras la adición de glucosa. De los trabajos de Boles, E. y Zimmermann, F. K., (1993) se puede deducir que la total inducción de la actividad Pdc requiere la acumulación de hexosas-fosfato y de triosas-fosfato. Un alto nivel de



triosas-fosfato parece ser la señal principal, pero alguna hexosa-fosfato actúa como señal complementaria.

Los niveles de las proteínas de los ribosomas citoplasmáticos son mas elevados cuando la levadura dispone de glucosa, a una concentración superior al 0.1%. Se ha comprobado que esto se debe a una combinación de control transcripcional y de regulación post-transcripcional que estabiliza los mRNAs correspondientes. El aumento en la vida media de los mRNAs se produce al pasar la levadura de un medio sin glucosa a un medio con el azúcar y es solo transitorio. La estabilización requiere la presencia de alguna enzima fosforilante de glucosa y parece ser menos acusada en una cepa carente de los sensores Rgt2 o Snf3 (Yin, Z. *et al.*, 2003).

Además de actuar a nivel de la transcripción génica, la glucosa también puede ejercer efectos sobre la actividad enzimática de algunas proteínas provocando tanto su activación, en el caso de la adenilato ciclasa, la ATPasa de membrana plasmática o la trehalasa, como su inactivación/degradación, en el caso de la FbPasa o el transportador de galactosa Gal2.

La activación de la adenilato ciclasa se observa pocos segundos después de la adición de la glucosa. Como indicamos anteriormente esta activación está mediada por el receptor de membrana plasmática Gpr1 acoplado a la proteína G, Gpa2. Se ha comprobado que requiere también algún producto del metabolismo de la glucosa (Yun, C. W. *et al.*, 1998, Kraakman, L. *et al.*, 1999, Rolland, F. *et al.*, 2000). La activación de la adenilato ciclasa produce un aumento en los niveles de cAMP que a su vez activa a la proteína quinasa A. Uno de los sustratos de esta enzima es la trehalasa neutra que se activa al ser fosforilada (Van Solingen, P. y Van Der Plaat, J. B., 1975, Uno, I. *et al.*, 1983, App, H. y Holzer, H., 1989).

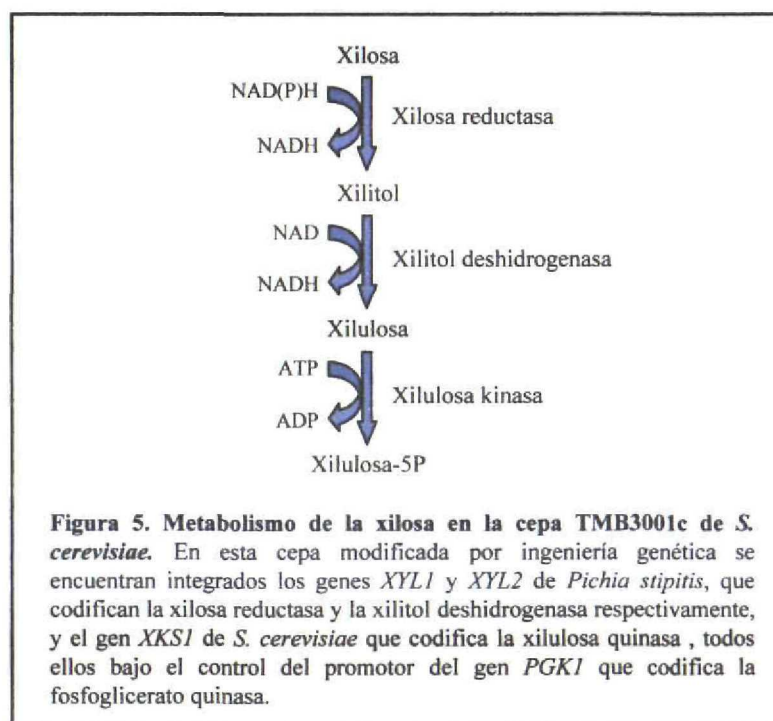
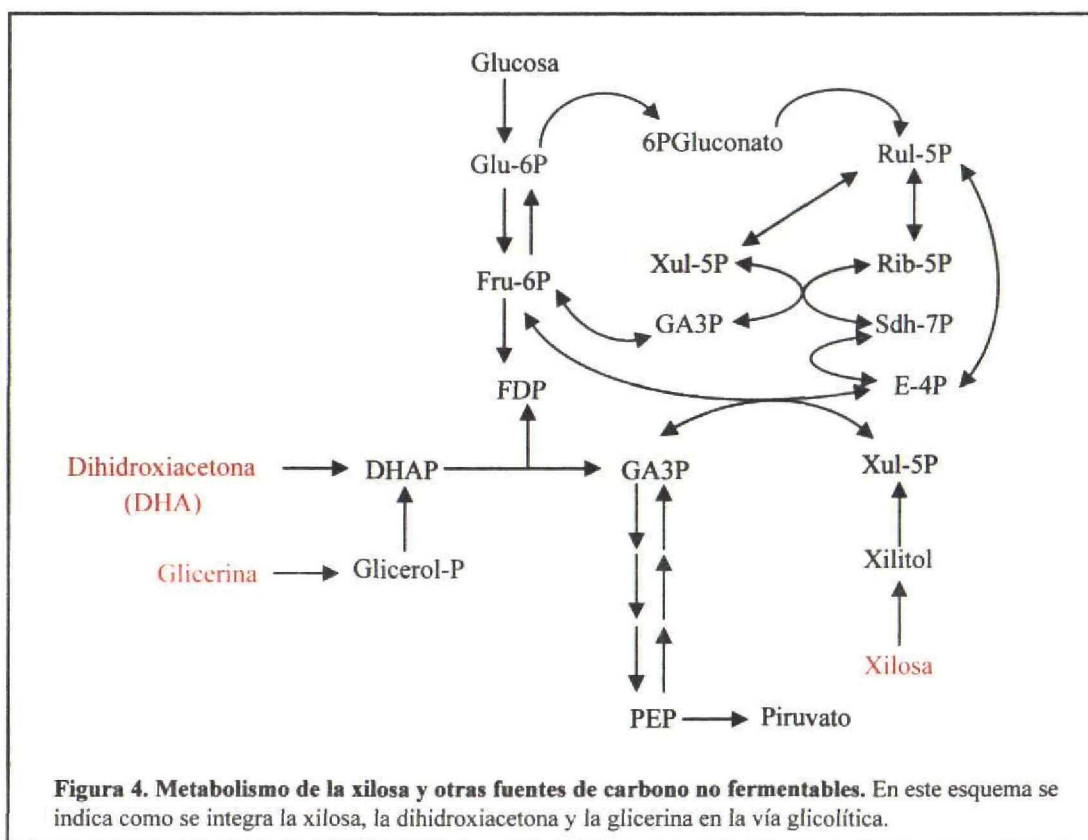
La H<sup>+</sup>-ATPasa de *S. cerevisiae* está codificada por el gen *PMAl* y es la proteína más abundante de la membrana plasmática de la levadura, siendo indispensable para su supervivencia. Esta enzima es activada por glucosa (Serrano, R., 1983) y hay evidencia de que la activación está mediada por la fosforilación de la proteína (Eraso, P. y Portillo, F., 1994). Sin embargo no parece que esta fosforilación la lleve a cabo la proteína quinasa A (Mazon, M. J. *et al.*, 1989, Dos Passos, J. B. *et al.*, 1992); aunque se ha implicado a la proteína quinasa Ptk2 en el proceso es posible que ésta no actúe

directamente sobre la ATPasa (Goossens, A. *et al.*, 2000). Mientras que no existen datos concluyentes acerca del papel de Gpr1 y de los otros dos sensores para glucosa, Snf3 y Rgt2, en la activación de la ATPasa (Souza, M. A. *et al.*, 2001, Kotyk, A. *et al.*, 2003), parece que la fosforilación del azúcar es absolutamente necesaria (Dos Passos, J. B. *et al.*, 1992, Souza, M. A. *et al.*, 2001, Kotyk, A. *et al.*, 2003).

La inactivación de la enzima FbPasa producida por la adición de glucosa a levaduras que crecen en una fuente de carbono no fermentable se debe a dos procesos distintos: una inactivación rápida (1-2 minutos) reversible causada por una fosforilación catalizada por la protein quinasa dependiente de cAMP (Mazón, M. *et al.*, 1982) y una inactivación irreversible en un plazo de 1-2 horas debida a degradación de la proteína, bien por proteasas vacuolares (Chiang, H. L. y Schekman, R., 1991) o bien por el proteasoma 26S tras una previa ubiquitinización (Schork, S. M. *et al.*, 1995). Según la información disponible hasta el momento, el inicio de la proteólisis de la FbPasa parece requerir un transporte eficiente de la glucosa y la fosforilación del azúcar por la hexoquinasa 2. Las proteínas reguladoras Grr1 y Reg1 jugarían un papel importante en el proceso, mientras que Snf3, Rgt2, Mth1 y Std1 no estarían involucradas (Horak, J. *et al.*, 2002). La degradación del transportador de galactosa, Gal2, que también es estimulada por glucosa parece responder a la misma vía de señalización (Horak, J. *et al.*, 2002).

Otro papel importante de la glucosa del que haremos solo una breve mención es la activación de genes que regulan la progresión del ciclo celular. Se ha comprobado que la inducción por glucosa de genes relacionados con dicho ciclo, *CLN3*, *BCK2* o *CDC28*, no requiere los sensores Snf3 y Rgt2 ni la proteína Hxk2 pero sí el metabolismo de la glucosa (Newcomb, L. L. *et al.*, 2003). La glucosa también activa el ciclo celular a través de la proteína Pop2, una desadenilasa, codificada por el gen *POP2* (*CAF1*). Cuando no existe glucosa en el medio Pop2 es fosforilada por la quinasa Yak1 y promueve la parada del ciclo celular. La glucosa estimula la salida de Yak1 del núcleo y la desfosforilación de Pop2 que permite una rápida progresión del ciclo celular. Para la desfosforilación de Pop2 es necesario que la glucosa se fosforile pero no se ha examinado si los sensores de membrana juegan algún papel (Moriya, H. *et al.*, 2001). Aunque el ayuno de glucosa provoca tanto una rápida despolarización del





citoesqueleto como una inhibición en la iniciación de la transcripción se ha mostrado que los dos procesos están regulados de forma independiente (Uesono, Y. *et al.*, 2004).

En este trabajo se ha estudiado de una manera sistemática cómo afecta la ausencia de los distintos elementos iniciales de la vía de señalización de la glucosa a una diversidad de procesos controlados por dicho azúcar.

Por otro lado, hemos seleccionado algunas fuentes de carbono no fermentables, xilosa, dihidroxiacetona (DHA) y glicerina, que utilizan diferentes vías metabólicas (fig. 4) y hemos analizado su capacidad para reprimir la expresión de una variedad de genes de *S. cerevisiae*. También hemos intentado establecer una correlación entre el grado de represión producido por estas fuentes de carbono y la concentración de determinados metabolitos intracelulares. Debido a que *S. cerevisiae* es incapaz de metabolizar las pentosas como fuente de carbono, hemos usado para estos estudios una cepa modificada por ingeniería genética capaz de crecer en xilosa. (fig. 5).

## *2. INTRODUCCIÓN.*

### ***3. OBJETIVOS.***



Los principales objetivos de esta tesis doctoral son:

- Estudio del efecto de la falta de los sensores de membrana plasmática para la glucosa sobre diferentes procesos desencadenados por dicho azúcar en *S. cerevisiae*.
- Estudio del efecto de la ausencia de enzimas fosforilantes de glucosa sobre procesos desencadenados por este azúcar.
- Análisis de la capacidad de diferentes fuentes de carbono no fermentables para producir represión catabólica en *S. cerevisiae*.

En el curso del trabajo se desarrolló una tecnología de toma de muestras de levadura para la determinación de niveles de RNA mensajeros. Se muestra en un apéndice cómo esa metodología aumenta 2-5 veces el rendimiento de los mRNAs.

#### *4. MATERIAL Y MÉTODOS.*

## 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se muestran en la tabla 1.

La cepa de *Yarrowia lipolytica*, PO1a MATa *leu2-270 ura3-302* fue proporcionada por C. Gallardin (Thiverval-Grignon, Francia).

Para la amplificación de plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  [*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\Phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*] (Hanahan, D., 1985).

Tabla 1.  
Cepas de *S.cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante	Referencia/origen
W303-1A	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	(Thomas, B. J. y Rothstein, R., 1989)
MMB3	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 gpr1::KanMX4</i>	Este trabajo.
MJL30	MAT $\alpha$ <i>leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 ura3-1 snf3::HIS3 rgt2::LEU2 mth1::TRP1</i>	Este laboratorio.
MMB4	MAT $\alpha$ <i>leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 ura3-1 snf3::HIS3 rgt2::LEU2 mth1::TRP1 gpr1::KanMX4</i>	Este trabajo.
THG1	MAT $\alpha$ <i>leu2-1 ura3-1 lys1-1 hck1::LEU2 hck2::LEU2 glk1::LEU2</i>	Este laboratorio
MMB2	MAT $\alpha$ <i>leu2-1 ura3-1 lys1-1 hck1::LEU2 hck2::LEU2 glk1::LEU2 gpr1::KanMX</i>	Este trabajo.
THG1-HXK2	MAT $\alpha$ <i>leu2-1 ura3-1 lys1-1 hck1::LEU2 glk1::LEU2</i>	Este laboratorio
CJM182	MAT $\alpha$ <i>leu2-1</i>	D. G. Fraenkel
CJM183	MAT $\alpha$ <i>hck1::LEU2 hck2::LEU2 GLK1 lys1-1</i>	D. G. Fraenkel
CJM184	MAT $\alpha$ <i>hck1::LEU2 HXK2 glk1::LEU2 leu2-1 lys1-1</i>	D. G. Fraenkel
CJM185	MAT $\alpha$ <i>HXK1 hck2::LEU2 glk1::LEU2 leu2-1 lys1-1</i>	D. G. Fraenkel
MMB5	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 [HXT1-lacZ]</i>	Este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante	Referencia/origen
MMB6	MATa <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 gpr1::KanMX [HXT1-lacZ]</i>	Este trabajo.
MMB7	MATα <i>leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 ura3-1 snf3::HIS3 rgt2::LEU2 mth1::TRP1 [HXT1-lacZ]</i>	Este trabajo.
MMB8	MATα <i>leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 ura3-1 snf3::HIS3 rgt2::LEU2 mth1::TRP1 gpr1::KanMX [HXT1-lacZ]</i>	Este trabajo.
MMB9	MATα <i>leu2-1 ura3-1 lys1-1 hck1::LEU2 hck2::LEU2 glk1::LEU2 [HXT1-lacZ]</i>	Este trabajo.
MMB10	MATα <i>leu2-1 ura3-1 lys1-1 hck1::LEU2 hck2::LEU2 glk1::LEU2 gpr1::KanMX [HXT1-lacZ]</i>	Este trabajo.
MMB11	MATα <i>leu2-1 ura3-1 lys1-1 hck1::LEU2 glk1::LEU2 [HXT1-lacZ]</i>	Este trabajo.
TMB3001c	MATα <i>leu2 trp1 ura3 his::HIS3 XYL1 XYL2 XKS1</i>	(Eliasson, A. et al., 2000)
CEN.PK102-5B	MATα <i>ura3-52 his3-Δ1 leu2-3,112</i>	Proporcionada por P. Kötter (Frankfurt, Alemania).
S288c	MAT a <i>SUC2 mal gal2 CUP1</i>	Yeast Genetic Stock Center, Berkeley CA, USA

## 4.2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

### 4.2.1 Medios de cultivo para levaduras.

Las cepas de levadura fueron crecidas a 30°C con aireación en:

- medio rico (YP) que contiene 1% de extracto de levadura (Pronadisa) y 2% de peptona (Pronadisa) (Sherman, F. y Hicks, J. B., 1991).
- medio mínimo YNB, Yeast Nitrogen Base, (Difco) y sulfato amónico 0.5% (Riedel-de Haën AG.). Este medio fue suplementado con los requerimientos necesarios en cada caso a una concentración final de 20 mg/l (Sherman, F. y Hicks, J. B., 1991).

Las fuentes de carbono, salvo indicación contraria, se añadieron a las siguientes concentraciones finales: glucosa, galactosa, etanol y xilosa al 2%, glicerina al 3% y



dihidroxiacetona al 0.5%. Para el crecimiento en medio sólido se añadió agar al 2% (Panreac) a los medios correspondientes.

Como medio de pre-esporulación se usaron placas de YP glucosa 10% y para la esporulación se utilizaron placas de acetato potásico 10 g/l.

Para la selección de los transformantes de levadura por el marcador de resistencia a geneticina (KanMX4) éstos se crecieron en placas de YPglucosa que contenían 200 mg/l de G418 (geneticina, Sigma).

Para conservar las levaduras durante períodos largos de tiempo a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se utilizó una solución de YPglicerina al 25%.

### 4.2.2 Medios de cultivo para bacterias.

El cultivo de bacterias a  $37^{\circ}\text{C}$  se realizó en LB, medio compuesto por bactotripton, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%, al cual se le añadió ampicilina a una concentración final de 100 mg/l para poder seleccionar los transformantes resistentes a dicho antibiótico.

Para la identificación de las colonias que estuvieran expresando o no el gen *lacZ* se añadió a las placas X-Gal (40 mg/l) e IPTG (80 mg/l).

### 4.2.3 Condiciones de crecimiento para levaduras.

Las cepas de levadura se crecieron a  $30^{\circ}\text{C}$ , con agitación (200 r.p.m.) en los medios descritos.

La concentración de levadura en un cultivo se calculó midiendo la densidad óptica (D.O.) de éste a 660 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 Bausch & Lomb, y utilizando curvas de calibración previamente establecidas. En estas condiciones 1 mg de levadura (peso humedo)/ml corresponde a una D.O. de 0.265.

Para los ensayos de desrepresión de enzimas reprimibles por glucosa, las levaduras recogidas en condiciones de represión (fase exponencial del crecimiento en YP glucosa) se trataron de diferente forma según la enzima estudiada en cada caso:

- para desreprimir las enzimas fructosa-1,6-bisfosfato (FbPasa), isocitrato liasa (ICL) y glutámico deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  (GlutDH), la levaduras se resuspendieron a 20  $\text{mg}_{\text{peso húmedo}}/\text{ml}$ , en YPetanol o YPetanol+glicerina y se incubaron a 30°C, con agitación, durante 6 horas.

- para desreprimir e inducir la galactoquinasa se resuspendieron a 20  $\text{mg}_{\text{peso húmedo}}/\text{ml}$  en YPgalactosa y se incubaron 30°C, con agitación, durante 5 horas.

- para desreprimir la invertasa se resuspendieron a 1.5  $\text{mg}_{\text{peso húmedo}}/\text{ml}$  en YPglucosa al 0.05% y se incubaron 30°C, con agitación, durante 3 horas.

La adición de otras fuentes de carbono a los medios descritos arriba se indica en cada caso.

La rápida transición de la levadura de condiciones gluconeogénicas (YPglicerina+etanol) a glicolíticas se llevó a cabo añadiendo al medio glucosa 20% para alcanzar una concentración final de 0.5%. (Se tomó una muestra control justo antes de añadir la glucosa (tiempo 0) y dos muestras 7 y 14 minutos más tarde).

### 4.3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.

#### 4.3.1. Preparación de extractos celulares.

Para las valoraciones enzimáticas se tomaron muestras de aproximadamente 100 mg de levadura (peso húmedo) en las condiciones descritas en el apartado 4.2.3. Las levaduras se recogieron por centrifugación a 2500 r.p.m., y se lavaron dos veces con agua desionizada. Las alícuotas así recogidas se guardaron a -20°C hasta su utilización.

Los extractos libres de células se obtuvieron por rotura mecánica con bolas de vidrio en tampón imidazol 20mM pH 7 según Blázquez, M. A. *et al.*, (1993). Excepto en el caso de la valoración de la piruvato descarboxilasa para la cual se empleó un tampón compuesto por fosfato 0.1 M pH 6, cisteína 5 mM y tiamina PP 30 $\mu$ M.

#### 4.3.2. Valoraciones enzimáticas.

Las valoraciones enzimáticas se realizaron a 30°C, siguiendo los protocolos descritos en las referencias que se indican en cada caso:

- . Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FbPasa). EC 3.1.3.11. D-fructosa-1,6-bisfosfato 1-fosfohidrolasa (Gancedo, J. M. y Gancedo, C., 1971, Funayama, S. *et al.*, 1980).

- . Glutámico deshidrogenasa NAD<sup>+</sup> dependiente (GlutDH). EC 1.4.1.2. L-glutamato: NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa (desaminante) (Doherty, D., 1970).

- . Isocitrato liasa (ICL) EC 4.1.3.1. Treo-Ds-isocitrato glioxilato-liasa (Dixon, G. H. y Kornberg, H. L., 1959).

- . Invertasa. EC 3.2.1.26.  $\beta$ -D-fructo furanosidasa (Goldstein, A. y Lampen, J. O., 1975). En este caso la actividad se valoró en células enteras usando sacarosa como sustrato. La glucosa y fructosa formadas en la reacción se determinaron espectrofotométricamente con hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa/ glucosa fosfato isomerasa según Bergmeyer, H. U., (1983).

- .  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal). EC 3.2.1.22.  $\beta$ -D-galactósido galactohidrolasa. Según Miller, J. H., (1972). En este caso, se omitió el paso de centrifugación en la preparación de los extractos celulares. Después del ensayo, la mezcla de la reacción se centrifugó 10 minutos a 13000 r.p.m. antes de medir la absorbancia a 420 nm.

- . Hexoquinasa (HXK). EC 2.7.1.1. ATP: D-hexosa 6-fosfotransferasa (Gancedo, J. *et al.*, 1977).

- . Piruvato descarboxilasa (Pdc). EC 4.1.1.1. 2-Oxo-acid carboxi-liasa (Singer, T. P. y Pensky, J., 1952).

- . Galactokinasa. EC 2.7.1.6. ATP: D-galactosa 1- fosfotransferasa (Cardini, C. E. y Leloir, L. F., 1953)

La concentración de proteína presente en los extractos se cuantificó usando el reactivo comercial BCA (ácido bicinchonínico) de Pierce con seroalbúmina bovina (1 mg/ml) como patrón.



La actividad enzimática específica se expresa en mU/mg de proteína, siendo una unidad de actividad enzimática la cantidad de enzima que transforma un  $\mu\text{mol}$  de sustrato en un minuto en las condiciones de temperatura en las que se realiza el ensayo.

Como medida indirecta de la activación de la  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática se midió la acidificación del medio provocada por glucosa o galactosa como se describe en Rodríguez, C. y Gancedo, J. M., (1999), manteniendo la suspensión de levadura a  $25^\circ\text{C}$ .

### 4.3.3. Recogida de muestras para valoración de metabolitos intracelulares.

Se recogieron aproximadamente 150 mg de levadura (peso húmedo) por filtración a través de membranas de nitrocelulosa MILLIPORE AAWPO4700 de  $0.8\ \mu\text{m}$  de diámetro de poro, congelando inmediatamente el filtrado en nitrógeno líquido según Saez, M. J. y Lagunas, R., (1976). Los extractos para las valoraciones se obtuvieron de la siguiente forma: se precalentó durante 5 min un tubo de plástico con 4 ml de etanol, en un baño de agua hirviendo. Se añadió la pella de levadura congelada sobre el etanol y se agitó vigorosamente. Se incubó 2 min en el baño y a continuación se congeló en nitrógeno líquido. La muestra se liofilizó y el residuo sólido se resuspendió en 1-2 ml de Imidazol 20 mM pH 7. A continuación se centrifugó en frío a 13000 r.p.m. durante 10 min. El sobrenadante se utilizó para la determinación de metabolitos.

### 4.3.4. Valoración de la concentración de metabolitos intracelulares.

Las concentraciones de glucosa-6-fosfato (G6P), fructosa-6-fosfato (F6P), fructosa-1,6-bisfosfato (FDP), triosas fosfato (TP) y ATP, en los extractos obtenidos, se determinaron por procedimientos enzimáticos según Bergmeyer, H. U., (1983). Para los cálculos se aceptó que 1g de levadura (peso húmedo) tiene un volumen de 0.6 ml (Conway, E. J. y Downey, M., 1950).

### 4.3.5. Valoración de la concentración de xilosa.

La xilosa presente en las muestras se determinó mediante un método colorimétrico con floroglucinol (Eberts, T. J. *et al.*, 1979). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 0.52 ml, de los cuales 0.2 ml fueron transferidos tras completarse el ensayo a una placa multipocillos y se leyó la D.O.<sub>554 nm</sub> y D.O.<sub>480 nm</sub> para evitar interferencias por la presencia de glucosa. Debido a que comprobamos que la absorción que produce la glucosa en esas condiciones es la misma a 480 nm y a 554 nm, mientras que la xilosa sólo da una absorción significativa a 554 nm la cantidad de xilosa en las muestras fue calculada mediante la diferencia de D.O.<sub>554 nm</sub> - D.O.<sub>480</sub>.

### 4.3.6. Valoración de la concentración de xilitol.

La concentración de xilitol en las muestras se midió por un método enzimático. Como tampón se usó glicilglicina 50 mM y fosfato 25 mM (pH 8.6), el NAD se utilizó a 4 mM y se inició la reacción con 60 mU de sorbitol deshidrogenasa, una enzima que también es capaz de oxidar el xilitol. La velocidad de reducción del NAD se siguió durante los primeros 90 segundos, y se llevaron en paralelo estandars de 5-25 nmoles de xilitol.

### 4.3.7. Inactivación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Las levaduras se crecieron en YPetanol. Cuando alcanzaron una densidad óptica de 0.6 se tomaron muestras por centrifugación, antes (tiempo 0) y después de añadir glucosa al medio a una concentración final del 2%, a los tiempos indicados.

### 4.3.8. Desrepresión de la piruvato descarboxilasa.

Las levaduras fueron crecidas en YPetanol hasta la fase logarítmica del crecimiento (D.O. de 0.6) y tras tomar una muestra de referencia (tiempo 0) se

recogieron por centrifugación y se resuspendieron en YPD a 4 mg<sub>peso húmedo</sub>/ ml, tras lo cual se tomaron muestras según los tiempos indicados.

### 4.4. TÉCNICAS DE GENÉTICA CLÁSICA.

Los cruzamientos entre cepas haploides, aislamiento de cigotos, esporulación de diploides y micromanipulación de tetradas se realizaron según métodos convencionales (Sherman, F. y Hicks, J. B., 1991).

### 4.5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Las técnicas más usuales de manipulación de DNA (digestiones enzimáticas, PCR, ligaciones, etc) se realizaron según Sambrook, J. *et al.*, (1989). La extracción de DNA de geles de agarosa se llevó a cabo usando QIAquick Gel Extration Kit de QIAGEN.

#### 4.5.1. Plásmidos utilizados.

Los plásmidos utilizados en este trabajo son los siguientes:

- pGEMT-easy: plásmido linearizado con *EcoRV* que contiene extremos protuberantes 3'T, que permiten la clonación de cualquier producto de PCR amplificado con la enzima Taq polimerasa por complementariedad de sus extremos (Promega).

- pGPR1-RS416: Contiene el gen *GPR1* (de *SacI* a *StuI*) insertado en el sitio *SacI-SmaI* de pRS416 (Yun, C. W. *et al.*, 1998).

- pFA6a-KanMX4: Contiene el gen KanMX con el promotor y el terminador del gen *TEF* de *S. cerevisiae*. (Wach, A. *et al.*, 1994).

- pMMB1: Derivado del pGPR1-RS416 en el que se ha eliminado el fragmento de 2 Kb. *HpaI-BglII* del gen *GPR1* y se ha sustituido por el fragmento de 1.4 Kb. *EcoRV-BglII* del gen KanMX (pFA6a-KanMX4) (este trabajo).



- pMAB1: Derivado del plásmido pUC18 que contiene el gen *FBP1* (sin promotor) y 0.5 Kb de región 3' no codificante de *S.cerevisiae*.
- pJJ16: Contiene el fragmento *Bam*HI- *Hind*III de 1.5 Kb. del gen *ACT1* de *S. cerevisiae*.
- pHGS102: Contiene un fragmento *Bam*HI-*Sac*I del gen *FBA1* de *S.cerevisiae* insertado en pGEM-2.
- pRB58: Derivado del plásmido pBR322 que contiene el gen *SUC2* de *S.cerevisiae* (Carlson, M. y Botstein, D., 1982).
- pINA1101: Bluescript que contiene el gen *ACT1* de *Y. lipolytica* (Lambert, M. *et al.*, 1997).
- YEp351-HXT1: contiene el gen *HXT1* de *S. cerevisiae* en el vector episomal YEp351 (cedido por F. Portillo, Madrid).
- pCK169: plásmido multicopia que contiene el gen de fusión *HXT1::lacZ* (Ko, C. H. *et al.*, 1993).

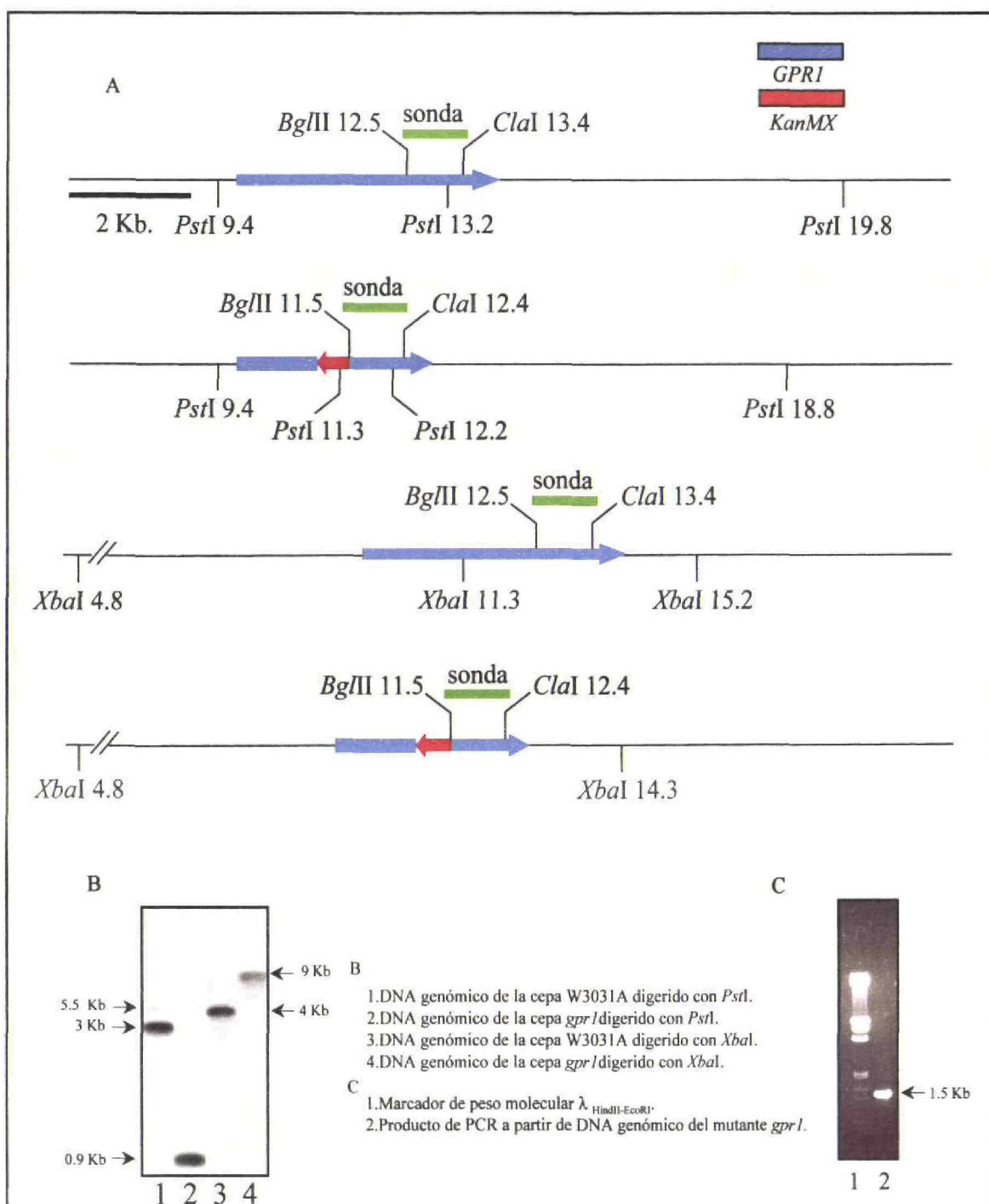
#### 4.5.2. Métodos de transformación celular.

Para la transformación de la bacteria *E.coli* se usó el método por choque térmico según Hanahan, D., (1985). En casos en que se necesitó una alta eficiencia de transformación, las bacterias se electroporaron tal y como se describe en Dower, W. J. *et al.*, (1988).

La preparación de células de levadura competentes así como la transformación de las mismas se llevó a cabo según el método que se describe en Ito, H. *et al.*, (1983)

#### 4.5.3. Aislamiento de DNA plasmídico de *E.coli*.

Las minipreparaciones de plásmidos de *E.coli* se llevaron a cabo según Holmes, D. y Quigley, M., (1981). La preparación de plásmidos a gran escala se realizó por lisis alcalina según Birnboim, H., (1983).



#### 4.5.4. Obtención de DNA genómico de levadura.

La obtención de DNA de alto peso molecular requerido para Southern y PCR se realizó mediante rotura de la levadura con bolas de vidrio siguiendo el procedimiento descrito por Hoffman, C. S. y Winston, F., (1987).

#### 4.5.5. Análisis del DNA genómico por el método de Southern.

La comprobación de la correcta interrupción génica se realizó digiriendo con las enzimas de restricción indicadas (*Pst*II y *Xba*I) 15Ude enzima/2μg de DNA genómico de levadura, posteriormente se siguió el procedimiento descrito por Southern, E. M., (1975) (fig. 6).

#### 4.5.6. Obtención de RNA total de levadura y análisis de northern

La toma de muestras de levadura, la extracción del RNA total así como el estudio de los mRNAs mediante sondas marcadas radiactivamente se realizó según se describe en Belinchón, M. M. *et al.*, (2004). En los experimentos relacionados con esta tesis las muestras fueron recogidas por filtración a temperatura ambiente y almacenadas a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Las sondas para northern utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 2.

Tabla 2.  
Sondas para northern blot.

Gen	Sonda
<i>ACT1</i>	Fragmento de 1.56 Kb producto de una digestión <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III del plásmido pJJ16 que contiene el gen <i>ACT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> (desde -477 a +1085).



<i>ICL1</i>	<p>Fragmento de 0.9 Kb (desde +603 a +1495) amplificado por PCR a partir de DNA genómico de la cepa W3031A de <i>S. cerevisiae</i> empleando los oligos:</p> <p>5'-TGCTGCTGGGATCCACATGG-3'</p> <p>5'-TGGGCATAAGCTTTCATCCC-3'</p>
<i>GDH2</i>	<p>Fragmento de 0.74 Kb (desde +1725 a +2468) amplificado por PCR a partir de DNA genómico de la cepa W3031A de <i>S. cerevisiae</i> utilizando los oligos:</p> <p>5'-CCATTTGGTAGCATGATATCC-3'</p> <p>5'-TTCAGAGATATCGCAAGG-3'</p>
<i>FBP1</i>	<p>Fragmento de 0.82 Kb (desde +57 a +877) producto de una digestión <i>EcoRV-StuI</i> del plásmido pMAB1.</p>
<i>FBA1</i>	<p>Fragmento de 0.67 Kb (desde +1162 a +1832) producto de una digestión <i>NcoI-NcoI</i> del plásmido pHGS102.</p>
<i>PMA1</i>	<p>Fragmento de 1.23 Kb (desde +1740 a +2970) producto de una digestión <i>BstXI-BstXI</i> (cedido por F. Portillo).</p>
rRNA 25S	<p>Fragmento de 1.27 Kb amplificado por PCR a partir de DNA genómico de la cepa W3031A de <i>S. cerevisiae</i> usando los oligos:</p> <p>5'-AGGTCGTACTGATAACCGCAG-3'</p> <p>5'-ATGGTGCTTCGCGGCAATGCC-3'</p>
rRNA 18S	<p>Fragmento de 0.91 Kb amplificado a partir de DNA genómico de la cepa W3031A de <i>S. cerevisiae</i> usando los oligos:</p> <p>5'-CCTTAACGAGGAACAATTGGAGG-3'</p> <p>5'-GGCATCACAGACCTGTTATT-3'</p>
L-A dsRNA	<p>Fragmento de 1.2 Kb amplificado a partir de cDNA de la cepa W3031A de <i>S. cerevisiae</i> usando los oligos:</p> <p>5'-GAGTACAAGCTGTATCGCGTCA-3'</p> <p>5'-CACCTTTGCTGCCTCTGCCTGG-3'</p>
<i>YIACT1</i>	<p>Fragmento de 1.07 Kb producto de una digestión <i>ScaI-XhoI</i> del plásmido pINA1101 que contiene el gen <i>ACT1</i> de <i>Y. lipolytica</i>.</p>



<i>YITEF1</i>	Fragmento de 1.4 Kb amplificado por PCR a partir de DNA genómico de la cepa PO1a de <i>Y. lipolytica</i> utilizando los oligos: 5'-CACTAGGTACAAGCAGCTTA-3' 5'-TAAGAATCATTCAAAATGGG-3'
rRNA 18S	Fragmento de 0.84 Kb amplificado a partir de DNA genómico de la cepa PO1a de <i>Y. lipolytica</i> usando los oligos: 5'-CCTTAACGAGGAACAATTGGAGG-3' 5'-GGCATCACAGACCTGTTATT-3'
<i>SUC2</i>	Fragmento de 0.8 Kb producto de una digestión <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III del plásmido pRB58 (Carlson, M. y Botstein, D., 1982).
<i>HXT1</i>	Fragmento de 0.23 Kb amplificado a partir de DNA genómico de la cepa THG1 de <i>S.cerevisiae</i> usando los oligos: 5'-TCGTCAACTAGTTGATATACG-3' 5'-GGTGTCTACGTAACGGTTTCTAT-3'

#### 4.5.7. Análisis de western.

Se utilizaron extractos celulares preparados según se indica en el apartado 4.3.1, Se precipitaron 50µg de proteína de cada muestra con 0.5 ml de TCA 15% (ácido tricloroacético). Se resuspendieron a una concentración 0.4 mg/ml en el tampon de Laemmli (Laemmli, U. K., 1970) (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, DTT 20 mM, EDTA 2 mM, sacarosa 10% y azul de bromofenol 0.1 mg/ml). Las muestras se hirvieron durante 2 minutos y se separaron en geles de poliacrilamida 10% (gel concentrador con Tris-Hcl 0.75 M pH 8.8 y gel separador con Tris-Hcl 0.25 M pH 6.8), usando como tampon de electroforesis una solución de glicina 1.9 M y SDS 1% ajustada a pH 8.3 con Tris-base. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleider & Schuell, PROTRAN 0.45 µm) mediante transferencia húmeda, usando como tampón de transferencia Tris-base 250 mM, glicina 1.9 M y methanol 20%, con un aparato de BIORAD. Se aplicaron 2 mA por cm<sup>2</sup> de gel. Se tiñeron las proteínas que quedaron en el gel con azul de Coomasie 0.05%, metanol 50% y ácido acético 10% durante toda la

noche a temperatura ambiente. Las proteínas de la membrana se visualizaron con el colorante Ponceau (0.1% en ácido acético).

Las incubaciones con los anticuerpos primario (una hora y media) y secundario (una hora) así como las diluciones de los mismos, se realizaron en solución de lavado TBS 1X (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 137 mM), TWEEN 20 0.1% y 5% leche descremada en polvo (Fluka). Se utilizó una dilución 1/50.000 del anticuerpo primario anti-FbPasa de *S. cerevisiae* producido en conejos (Funayama, S. *et al.*, 1980) y una dilución 1/5000 del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a la peroxidasa de rábano (SC-2004, Santa Cruz Biotechnology, INC.). Para el revelado de los inmunoprecipitados se utilizó una solución compuesta por Tris-HCl 1M pH 8.8, ácido p-Cumárico 50 mM, luminol 50 mM y peróxido de oxígeno 3.6%.

## *5. RESULTADOS.*



## 5. RESULTADOS.

### 5.1. Efecto de la falta de los sensores de membrana en diferentes procesos desencadenados por la glucosa.

Como se planteó en la introducción se conoce ya el papel de los sensores de membrana para la glucosa Snf3, Rgt2 y Gpr1 en algunos procesos que ocurren como respuesta a la glucosa pero no está claro hasta que punto se requieren para otros. Para estudiar la cuestión hemos construido diversos mutantes carentes de uno, de dos o de los tres sensores de glucosa identificados en *S. cerevisiae*, concretamente mutantes *gpr1*, *snf3 rgt2* y *snf3 rgt2 gpr1*. En estas dos últimas cepas se ha deleciónado además el gen *MTH1* para permitir la síntesis de los transportadores de glucosa.

#### 5.1.1. Represión a corto y largo plazo de diversas enzimas.

Está establecido que no todas las enzimas sujetas a represión catabólica se regulan del mismo modo, sino que existen diferentes circuitos de regulación (Gancedo, J. M., 1998). Por lo tanto, hemos realizado medidas de actividad enzimática de dos enzimas pertenecientes a distintos circuitos: la enzima gluconeogénica fructosa-1,6-bisfosfatasa (FbPasa) y la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> (GlutDH), en condiciones de represión y desrepresión con las distintas cepas de estudio.

Los resultados que se muestran en la tabla 3 ponen de manifiesto que la ausencia de los sensores de glucosa no incrementa en ningún caso los niveles de las enzimas en condiciones de represión y que durante la desrepresión los niveles de FbPasa y GlutDH son semejantes en todas las cepas.

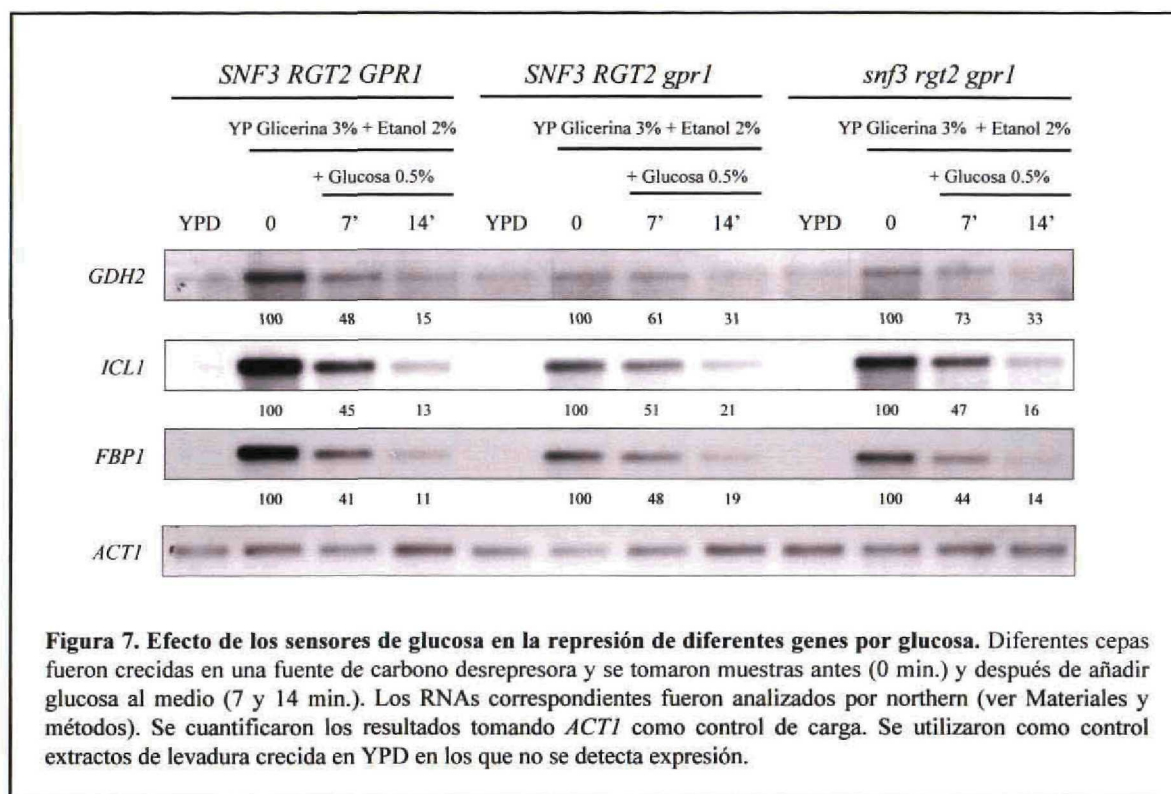
**Tabla 3. Efecto de la falta de sensores de membrana sobre la actividad de diversas enzimas.**

Enzima	Fuente de carbono	Silvestre	<i>gpr1</i>	<i>snf3rgt2</i>	<i>snf3rgt2gpr1</i>
FbPasa (mU/mgproteína)	2% Glucosa	≤1	≤1	≤1	≤1
	2% Etanol + 3% glicerina	29 ± 1	26 ± 5	28 ± 3	25 ± 4
GlutDH (mU/mg proteína)	2% Glucosa	10.2 ± 3	12 ± 2	12.7 ± 1	14 ± 2.6
	2% Etanol + 3% glicerina	124 ± 5	108 ± 12	101 ± 6	107 ± 7

Las levaduras se crecieron en medio rico (YP) con las fuentes de carbono que se indican en la tabla y se recogieron en la fase exponencial del crecimiento (2 mg<sub>peso húmedo</sub>/ml). Los extractos, las valoraciones enzimáticas y las de proteínas, se hicieron como se describe en el apartado 4.3.2. Los resultados son la media de 3 o más experimentos independientes ± la desviación estandar.

Esto sugiere que ninguno de los sensores se requiere para la represión catabólica pero podría ocurrir que sí jugaran algún papel en la fase de transición de la levadura de un crecimiento no fermentativo a uno fermentativo. Por ello realizamos un análisis de northern para comprobar qué ocurre a corto plazo con los niveles de mRNA correspondientes a genes que codifican enzimas susceptibles de ser reprimidas por glucosa tales como la fructosa-1,6-bisfosfatasa (*FBPI*), la isocitrato liasa (*ICLI*), y la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> (*GDH2*).

Como se muestra en la figura 7 tras la adición de glucosa hay un rápido descenso en los niveles de mRNA, similar en la cepa silvestre y en las cepas mutantes que carecen de *Gpr1* o de los tres sensores, *Snf3*, *Rgt2* y *Gpr1*.



### 5.1.2. Inducción y represión de la invertasa.

Resultaba especialmente interesante estudiar el efecto de la falta de los sensores de membrana en la expresión de la invertasa ya que esta enzima es inducida por bajas concentraciones de glucosa y reprimida a altas concentraciones de dicho azúcar. Evaluamos la actividad de la enzima sometiendo a la levadura, tanto silvestre como mutante para *gpr1*, *snf3 rgt2* y *snf3 rgt2 gpr1* respectivamente a condiciones represoras (2% glucosa) y desrepresoras (0.05% glucosa). Como se observa en los resultados de la tabla 4 la ausencia de sensores no impide que la enzima se reprima normalmente por glucosa alta. Sin embargo, los niveles de actividad a baja glucosa alcanzados por la cepa silvestre se ven disminuidos a la mitad en los mutantes *gpr1* y *snf3 rgt2* e incluso se reducen a un tercio en el triple mutante.

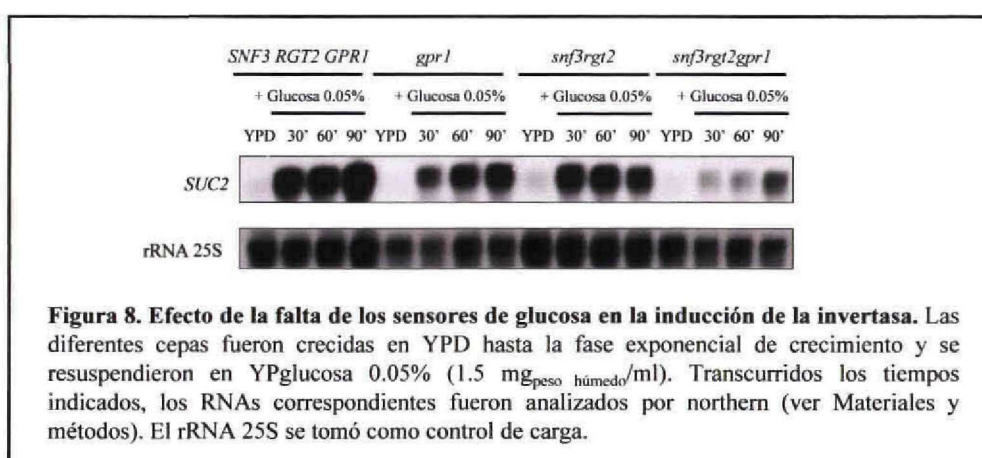


**Tabla 4. Efecto de la falta de sensores de membrana sobre la actividad de la invertasa.**

Enzima	Fuente de carbono	Silvestre	<i>gpr1</i>	<i>snf3rgt2</i>	<i>snf3rgt2gpr1</i>
Invertasa	2% Glucosa	<5	1	7	1
(mU/mg levadura)	0.05% Glucosa	230 ± 17	120 ± 16	112 ± 6	70 ± 14

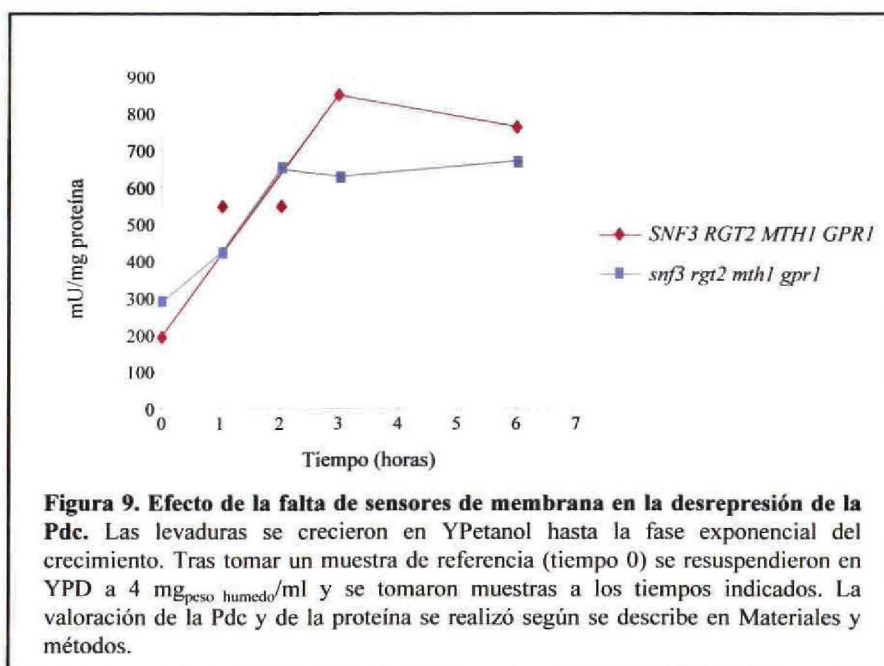
Las levaduras se crecieron en YPglucosa hasta la fase exponencial del crecimiento, resuspendiéndose posteriormente en YP 1.5 mg<sub>peso húmedo</sub>/ml con la glucosa indicada en la tabla y valorándose invertasa como se indica en el apartado 4.3.2. Los resultados son la media de 3 o más experimentos independientes ± la desviación estandar.

Con el fin de comprobar si el efecto que se observa en la actividad enzimática de la invertasa se debe a una regulación a nivel de la transcripción del mRNA o a un control postranscripcional llevamos a cabo un estudio cuantitativo de expresión del mRNA correspondiente a *SUC2* a lo largo de la desrepresión en glucosa al 0.05%. El resultado del análisis de northern muestra cómo la falta de los sensores disminuye el nivel máximo de expresión del gen de la invertasa, siendo el efecto más acusado en el triple mutante con niveles del mensajero un 40% de los del silvestre (fig. 8).



### 5.1.3. Inducción de la piruvato descarboxilasa.

Se compararon las cinéticas de inducción de la piruvato descarboxilasa en un mutante carente de los tres sensores de membrana para la glucosa y en una cepa silvestre. Como se observa en la figura 9 la actividad enzimática comienza a aumentar tras la adición de glucosa de forma muy semejante para ambas cepas, pero posteriormente la cepa *snf3 rgt2 gpr1* muestra un cierto retraso en la desrepresión y el nivel máximo de Pdc alcanzado es algo menor.



Por otro lado resultados preliminares muestran que el efecto de la falta de sensores sobre la inducción de la Pdc en levaduras crecidas en presencia de glucosa es muy poco marcado. Si acaso se observa una disminución de los niveles de Pdc en condiciones de desrepresión de alrededor de un 20% en la cepa *snf3 rgt2 gpr1* (tabla 5).

**Tabla 5. Efecto de la falta de sensores de membrana sobre la actividad de la piruvato descarboxilasa durante el crecimiento en glucosa.**

Enzima	Fuente de carbono	Silvestre	<i>gpr1</i>	<i>snf3 rgt2</i>	<i>snf3 rgt2 gpr1</i>
Pdc (mU/mg proteína)	2% Glucosa	1050	1100	960	875

Las levaduras se crecieron en YPglucosa hasta la fase exponencial del crecimiento, valorándose la actividad de la Pdc y de la proteína como se indica en el apartado 4.3.2.

#### 5.1.4. Inducción del transportador de glucosa *HXT1*.

Utilizando la fusión génica *HXT1-lacZ* hemos estudiado la inducción de dicho transportador de glucosa en presencia de diferentes fuentes de carbono y en distintas cepas de levadura carentes de algunos o de todos los sensores de membrana plasmática para la glucosa.

Como indican los resultados de la tabla 6 la falta de los sensores Snf3 y Rgt2 impide la expresión del transportador de glucosa *HXT1* cuando la levadura está creciendo en presencia de altas concentraciones de dicho azúcar, pero la falta de Gpr1 no tiene ningún efecto.

**Tabla 6. Efecto de la falta de sensores de membrana sobre la expresión del gen de fusión *HXT1-lacZ*.**

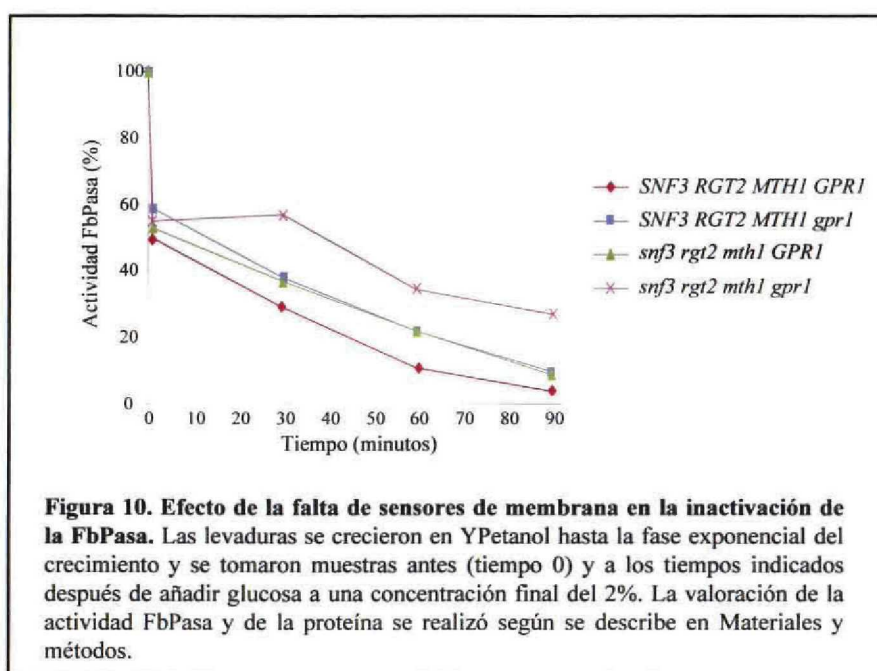
Enzima	Fuente de carbono	Silvestre	<i>gpr1</i>	<i>snf3 rgt2</i>	<i>snf3 rgt2 gpr1</i>
$\beta$ -galactosidasa (mU/mg proteína)	2% Galactosa	29	75	33	41
	2% Glucosa	2900 $\pm$ 1440	2040 $\pm$ 720	30 $\pm$ 10	40 $\pm$ 10

Las levaduras transformadas con el plásmido pcK169 (*HXT1::lacZ*) se crecieron en medio rico (YP) con las fuentes de carbono que se indican en la tabla, y se recogieron en la fase exponencial del crecimiento (2 mg<sub>peso húmedo</sub>/ml), valorándose la actividad  $\beta$ -galactosidasa y de la proteína como se indica en el apartado 4.3.2.



### 5.1.5. Inactivación de la FbPasa.

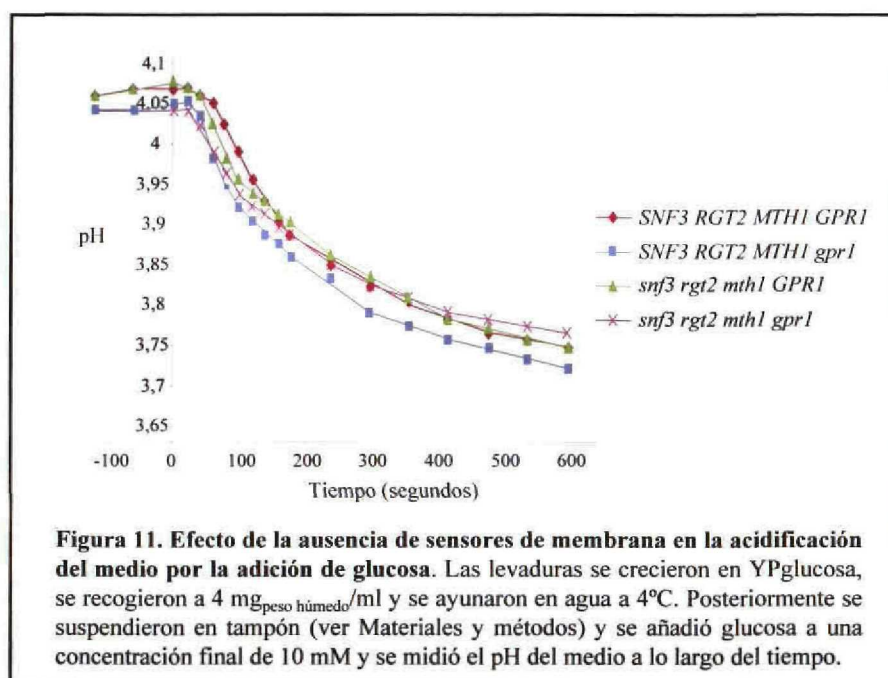
Como se comentó anteriormente, la glucosa desencadena la inactivación de diversas enzimas y transportadores de azúcar. El caso mejor estudiado es el de la FbPasa que sufre una primera inactivación reversible por fosforilación que ocurre inmediatamente después de añadir la glucosa (1-2 minutos), y una segunda inactivación irreversible por degradación proteolítica que tiene lugar en 1-2 horas. Los resultados que se muestran en la figura 10 indican que la ausencia de los sensores no modifica la secuencia temporal ni cuantitativa de la primera fase de inactivación de la enzima, sin embargo la falta de Snf3, Rgt2 o de Gpr1 produce un enlentecimiento en la inactivación por proteólisis de la FbPasa. El efecto es particularmente marcado cuando están ausentes los 3 sensores de glucosa.



### 5.1.6. Activación de la ATPasa de membrana.

Como representativa de los procesos de activación enzimática provocados por la glucosa se estudió la activación de la ATPasa de membrana. Para ello utilizamos una medida indirecta de la actividad de esta enzima como es la variación de pH

extracelular que tiene lugar como consecuencia de la expulsión al medio, por dicha ATPasa, de los protones producidos por el metabolismo de azúcares como la glucosa y la galactosa. Como se muestra en la figura 11 la ausencia de uno, dos o incluso de los tres sensores de membrana para glucosa identificados en *S. cerevisiae* no modifica el patrón de disminución del pH extracelular en comparación con la cepa silvestre.



## 5.2. Efecto de la ausencia de enzimas fosforilantes de glucosa en diferentes procesos desencadenados por glucosa.

Para evaluar el papel de distintas enzimas fosforilantes de glucosa en diferentes procesos que ocurren en la levadura en respuesta a la presencia de glucosa, hemos utilizado dos grupos de cepas. Por una parte cepas isogénicas que pueden expresar una sola de las enzimas fosforilantes de glucosa y su control silvestre (genotipos: *HXK1 HXK2 GLK1*, *HXK1 hxx2 glk1*, *hxx1 HXK2 glk1*, *hxx1 hxx2 GLK1*). Y por otra una cepa totalmente incapaz de fosforilar glucosa (*hxx1 hxx2 glk1*) junto con una cepa control en la que se ha reintroducido el gen *HXK2*.

### 5.2.1. Represión de diferentes enzimas durante el crecimiento.

Con las cepas descritas anteriormente hemos realizado medidas de actividad enzimática de diversas enzimas sujetas a represión catabólica y pertenecientes a distintos circuitos de regulación durante el crecimiento en distintas fuentes de carbono.

Los resultados que se muestran en la tabla 7 indican que la presencia de cualquiera de las tres enzimas fosforilantes permite la represión por glucosa de las enzimas gluconeogénicas, FbPasa e ICL. Se podría pensar que la falta de expresión en un medio con glucosa como única fuente de carbono se debe a la falta de algún inductor, pero tampoco se observa actividad enzimática en un medio con glucosa y etanol. En el caso de la GlutDH sólo la Hxk2 permite la total represión, ésta es moderada cuando está presente sólo la Hxk1 y muy escasa en la cepa con sólo Glk1.

**Tabla 7. Efecto de la ausencia de enzimas fosforilantes de glucosa sobre la actividad de diversas enzimas.**

Enzima	Fuente de carbono	Silvestre	<i>HXK2</i>	<i>HXK1</i>	<i>GLK1</i>
FbPasa (mU/mg proteína)	Glucosa	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$3 \pm 1$
	Glucosa+Etanol	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
	Etanol	$70 \pm 11$	$59 \pm 3$	$65 \pm 3$	$69 \pm 14$
ICL (mU/mg proteína)	Glucosa	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$2 \pm 1$
	Glucosa+Etanol	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	$2 \pm 1$
	Etanol	$148 \pm 17$	$154 \pm 29$	$133 \pm 23$	$138 \pm 15$
GlutDH (mU/mg proteína)	Glucosa	$8 \pm 2$	$10 \pm 2$	$44 \pm 9$	$120 \pm 15$
	Glucosa+Etanol	$11 \pm 1$	$12 \pm 1$	$43 \pm 11$	$71 \pm 20$
	Etanol	$157 \pm 10$	$173 \pm 8$	$169 \pm 21$	$188 \pm 29$

Las levaduras se crecieron en medio rico (YP) con las fuentes de carbono que se indican en la tabla y se recogieron en la fase exponencial del crecimiento ( $2 \text{ mg}_{\text{peso húmedo}}/\text{ml}$ ). Los extractos, las valoraciones enzimáticas y las de proteínas, se hicieron como se describe en el apartado 4.3.2. Los resultados son la media de 3 o más experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.



Como se muestra en la tabla 8, en la cepa silvestre la glucosa bloquea totalmente la inducción por galactosa de la galactoquinasa. En cambio, en el mutante que sólo posee Hxk1 la glucosa sólo reduce a la mitad la actividad de la enzima, y en el mutante con Glk1 la glucosa no tiene efecto.

**Tabla 8. Efecto de la ausencia de enzimas fosforilantes de glucosa sobre la actividad de la galactoquinasa.**

Enzima	Fuente de carbono	Silvestre	<i>HXK1</i>	<i>GLK1</i>
Galactoquinasa (mU/mg proteína)	Galactosa	$560 \pm 80$ (4)	$785 \pm 58$ (3)	$535 \pm 9$ (3)
	Galactosa	$\leq 20$ (4)	$384 \pm 80$ (4)	$540 \pm 100$ (5)
	+ Glucosa			

Las levaduras se crecieron en YP con las fuentes de carbono que se indican en la tabla y se recogieron en la fase exponencial del crecimiento ( $2 \text{ mg}_{\text{peso húmedo}}/\text{ml}$ ). Los extractos, las valoraciones enzimáticas y las de proteínas, se hicieron como se describe en el apartado 4.3.2. Los resultados son la media de 3 o más experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

En la tabla 9 se muestra que en una cepa carente de las tres enzimas fosforilantes de glucosa no se observan diferencias marcadas en los niveles de FbPasa, ICL, GlutDH y galactoquinasa entre levaduras crecidas en ausencia o presencia de glucosa.

**Tabla 9. Efecto de la ausencia de las tres enzimas fosforilantes de glucosa sobre la actividad de diversas enzimas.**

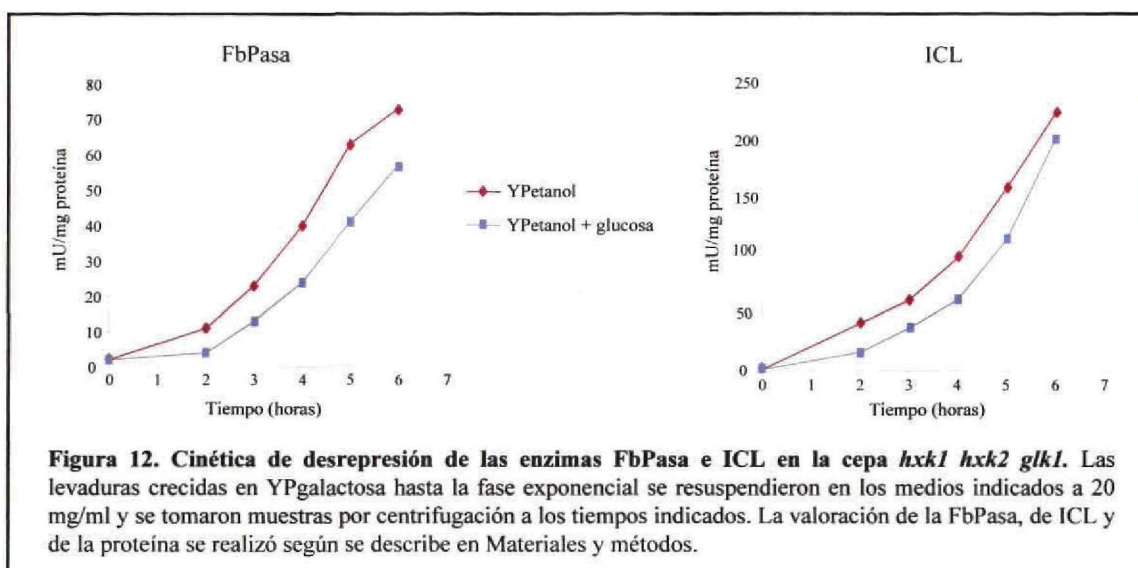
Enzima	Fuente de carbono	<i>hxx1 hxx2 glk1</i>
FbPasa (mU/mg proteína)	Etanol Etanol+Glucosa	$68 \pm 4$ $60 \pm 1$
ICL (mU/mg proteína)	Etanol Etanol+Glucosa	$170 \pm 2$ $145 \pm 6$
GlutDH (mU/mg proteína)	Etanol Etanol+Glucosa	$152 \pm 6$ $135 \pm 16$
Galactoquinasa (mU/mg proteína)	Galactosa Galactosa+Glucosa	$600 \pm 70$ $660 \pm 25$

Las levaduras se crecieron en medio rico (YP) con las fuentes de carbono que se indican en la tabla y se recogieron en la fase exponencial del crecimiento ( $2 \text{ mg}_{\text{peso húmedo}}/\text{ml}$ ). Los extractos, las valoraciones enzimáticas y las de proteínas, se hicieron como se describe en el apartado 4.3.2. Los resultados son la media de 3 o más experimentos independientes  $\pm$  la desviación estandar.

### 5.2.2. Cinética de desrepresión de diferentes enzimas.

Además de comprobar cómo afecta la glucosa la actividad enzimática de determinadas enzimas en la cepa *hxx1 hxx2 glk1* durante el crecimiento, pensamos que sería interesante también examinar si la glucosa afecta a la cinética de desrepresión.

Cómo se muestra en las figura 12 los niveles de desrepresión en etanol alcanzados por la FbPasa y por la ICL en esta cepa entre las 4 y 6 horas son similares a los obtenidos en condiciones de crecimiento (ver tabla 9). Sin embargo, se puede observar que cuando la glucosa está presente en el medio se produce un retraso claro en la desrepresión. En el caso de la enzima glutámico deshidrogenasa este retraso no se produce de forma consistente (resultados no mostrados).



### 5.2.3. Inducción y represión de la invertasa.

Ya hemos comentado que la invertasa tiene una relación particular con la glucosa, ya que bajas concentraciones de ésta promueven su inducción y altas concentraciones del azúcar reprimen la expresión de la enzima. Como con el resto de enzimas estudiadas en este trabajo examinamos cómo influye la falta de fosforilación de la glucosa a la actividad enzimática de la invertasa durante el crecimiento.

Como se muestra en la tabla 10, en galactosa la invertasa no se encuentra totalmente reprimida y se observa cierto aumento de los niveles de actividad de la enzima en presencia de una baja concentración de glucosa. Sorprendentemente a concentraciones altas de glucosa se produce una inducción de hasta 10 veces con respecto a la obtenida con 0.05% glucosa. En la cepa control que posee *Hxx2*, la invertasa se encuentra reprimida a 2% glucosa (17 mU/mg levadura), como era esperable, y se induce a 0.05% glucosa (410 mU/mg levadura).

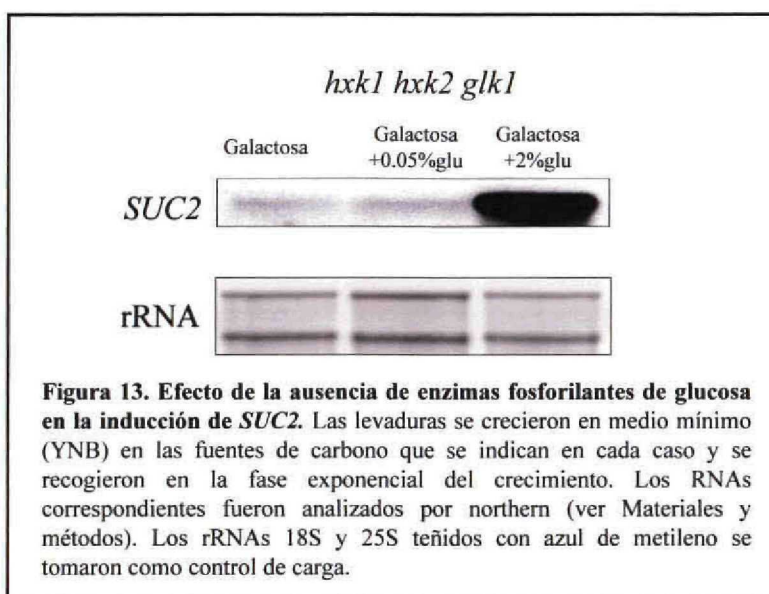


**Tabla 10. Efecto de la ausencia de las tres enzimas fosforilantes de glucosa sobre la actividad de la invertasa.**

Enzima	Fuente de carbono	<i>hxx1 hxx2 glk1</i>
Invertasa	Galactosa	59 ± 12
(mU/mg levadura)	Gal + 0.05% Glucosa	97 ± 14
	Gal + 2% Glucosa	750 ± 390

Las levaduras se crecieron en medio mínimo (YNB) con las fuentes de carbono que se indican en la tabla y se recogieron en la fase exponencial del crecimiento (D.O. 0.3). La valoración de la invertasa se realizó según como se describe en el apartado 4.3.2. Los resultados son la media de 3 o más experimentos independientes  $\pm$  la desviación estandar.

Ante estos resultados decidimos realizar un análisis de northern para comprobar si el efecto observado en la actividad enzimática de la invertasa se corresponde con la regulación a nivel de transcripción del gen *SUC2*. Los datos mostrados (fig. 13) confirman los elevados niveles de expresión de la invertasa a alta concentración de glucosa cuando ésta no se fosforila. En todos los casos se valoró la cantidad de glucosa presente en el medio en el momento de recoger la levadura, sin observarse un consumo apreciable de glucosa.

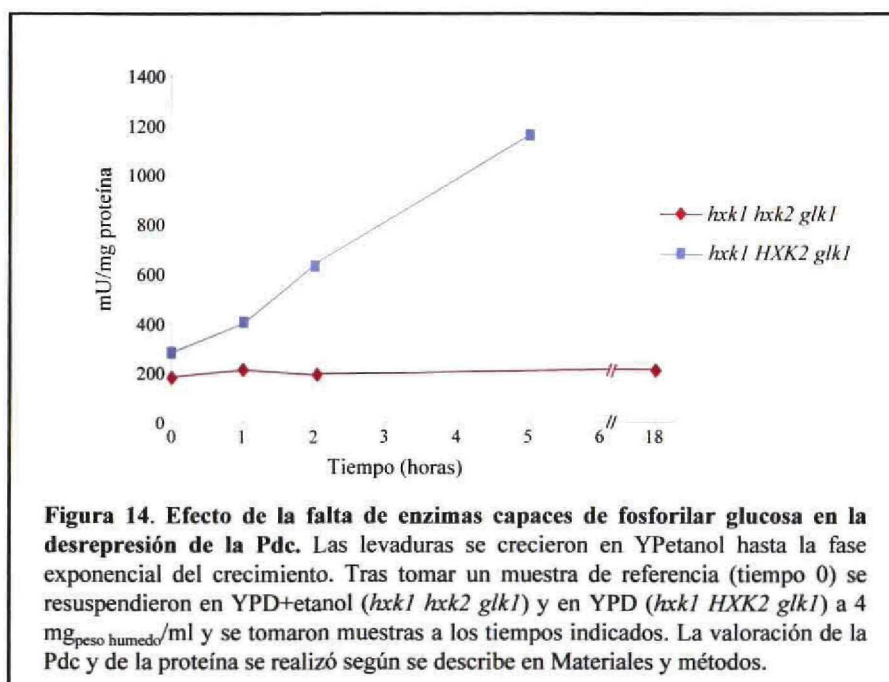


Por otra parte si la única enzima fosforilante de glucosa presente es la Hxx1 no existe represión por glucosa alta de la invertasa (1800 mU/mg levadura) alcanzándose

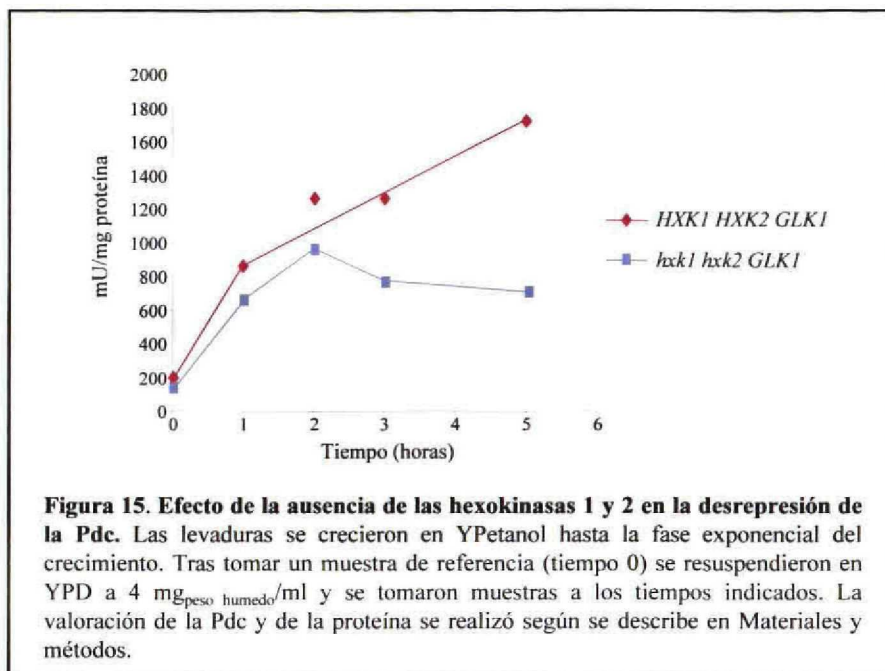
los mismos niveles que en condiciones de inducción, es decir, desreprimiendo la levadura en presencia de glucosa 0.05% (1500 mU/mg levadura). En la cepa silvestre isogénica la actividad invertasa está totalmente reprimida en presencia de glucosa 2% y alcanza unas 1200 mU/mg levadura durante la desrepresión en glucosa al 0.05%.

#### 5.2.4. Inducción de la piruvato descarboxilasa.

En ausencia de las enzimas capaces de fosforilar la glucosa no existe inducción de la Pdc en presencia de glucosa como se muestra en la cinética de desrepresión de la figura 14.



Cuando la única enzima capaz de fosforilar la glucosa es la Glk1 la cinética inicial de inducción de la Pdc es semejante a la de la cepa silvestre, sin embargo posteriormente no aumenta la actividad Pdc con lo que sólo alcanza un valor máximo de un 50% del de la cepa control (fig. 15).



Cuando las levaduras están creciendo en presencia de glucosa los niveles de Pdc son semejantes para la cepa silvestre y para las que sólo poseen Hxk1 o Hxk2. Sin embargo estos valores de actividad se reducen a la mitad si la enzima capaz de fosforilar la glucosa presente es la Glk1 (tabla 11).

**Tabla 11. Efecto de la ausencia de enzimas fosforilantes de glucosa sobre la actividad de la piruvato descarboxilasa durante el crecimiento en glucosa.**

Enzima	Fuente de carbono	Silvestre	<i>HXK2</i>	<i>HXK1</i>	<i>GLK1</i>
Pdc (mU/mg proteína)	2% Glucosa	1050 ± 80	1090 ± 150	1200 ± 120	610 ± 45

Las levaduras se crecieron en YPglucosa hasta la fase exponencial del crecimiento, valorándose la actividad de la Pdc y de la proteína como se indica en el apartado 4.3.2.



### 5.2.5. Inducción del transportador de glucosa *HXT1*.

De nuevo la construcción génica *HXT1-lacZ* nos ha permitido analizar la inducción de dicho transportador de glucosa en presencia de diferentes fuentes de carbono y en distintas cepas de levadura carentes de las enzimas capaces de fosforilar la glucosa.

Como se observa en la tabla 12 existe una cierta activación de más de 10 veces de la transcripción durante el crecimiento en glucosa de *HXT1* en ausencia de las enzimas capaces de fosforilar dicho azúcar. Aunque la inducción es unas 5 veces mayor cuando se ha restituido la *Hxk2* el nivel de expresión de *HXT1* no se ve disminuido con la falta del sensor *Gpr1*, pero la gran variabilidad en la actividad obtenida no nos permite asegurar que el aumento aparente observado sea significativo.

**Tabla 12. Efecto de la ausencia de enzimas fosforilantes de glucosa sobre la expresión del gen de fusión *HXT1-lacZ*.**

Enzima	Fuente de carbono	<i>hxx1 hxx2 glk1</i>	<i>hxx1 hxx2 glk1 gpr1</i>	<i>HXX2</i>
$\beta$ -galactosidasa (mU/mg proteína)	2% Galactosa	15 $\pm$ 9	17 $\pm$ 3	19 $\pm$ 3
	4% Glucosa	244 $\pm$ 13	430 $\pm$ 120	1210 $\pm$ 172

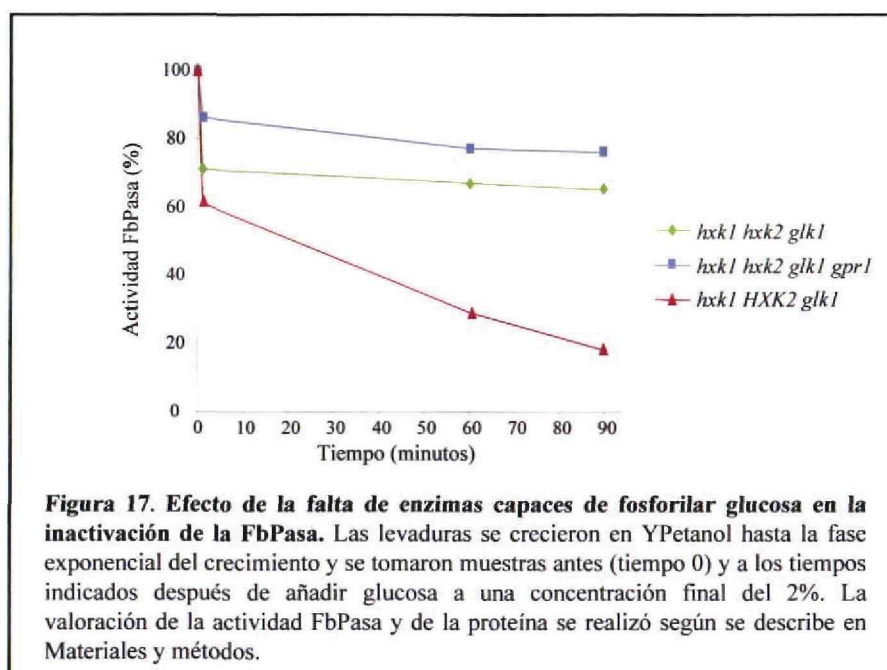
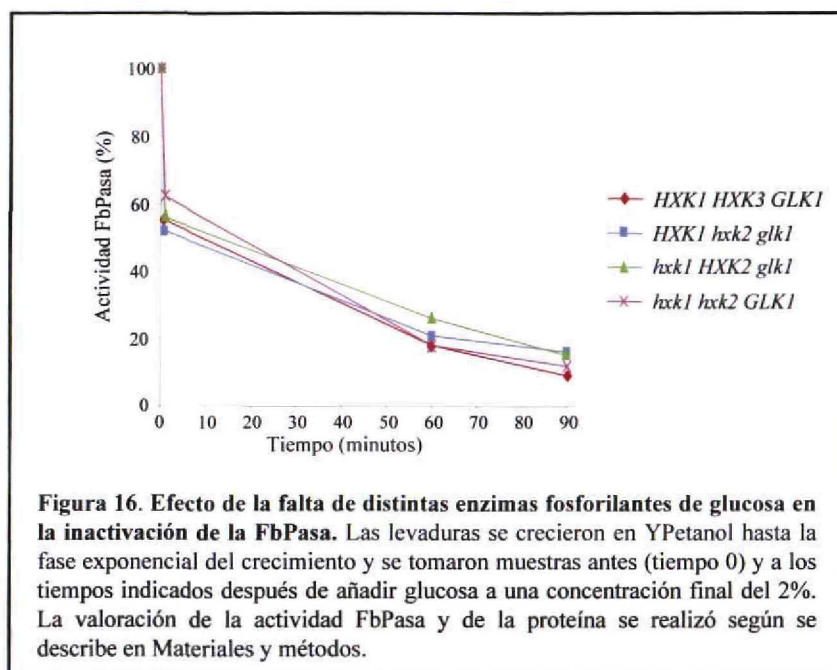
Las levaduras transformadas con el plásmido pcK169 (*HXT1::lacZ*) se crecieron en medio mínimo (YNB) con las fuentes de carbono que se indican en la tabla, y se recogieron en la fase exponencial del crecimiento (2 mg<sub>peso húmedo</sub>/ml), valorándose la actividad  $\beta$ -galactosidasa y de la proteína como se indica en el apartado 4.3.2.

### 5.2.6. Inactivación de la FbPasa.

Hemos examinado también el efecto de la falta de enzimas capaces de fosforilar la glucosa sobre el proceso de inactivación de la FbPasa.

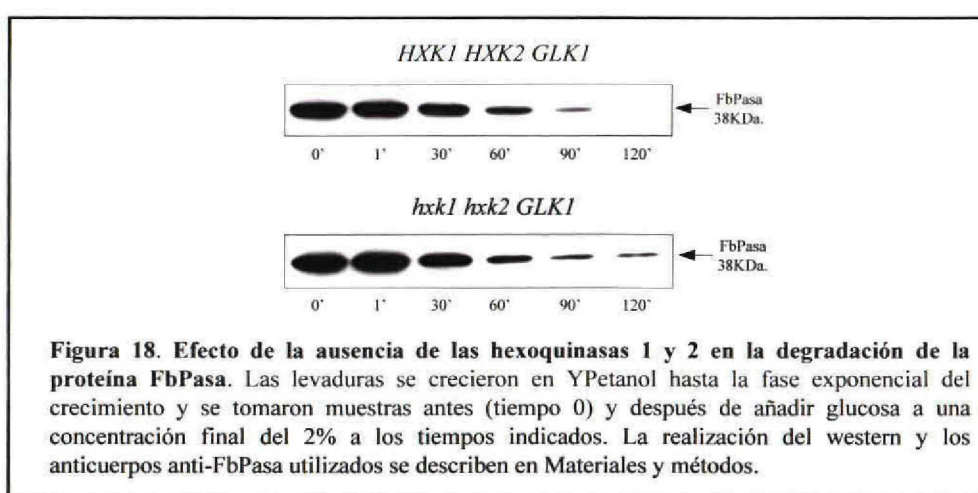
Como se puede observar en la figura 16 cualquiera de las tres enzimas fosforilantes de glucosa permite la inactivación de la FbPasa por dicho azúcar. En cambio la ausencia de las tres enzimas disminuye la inactivación a corto plazo

casusada por la fosforilación de la FbPasa y bloquea totalmente la inactivación debida a degradación proteolítica (fig. 17).



La ausencia del sensor de membrana Gpr1 en el triple mutante, *hxx1 hxx2 glk1*, tiene un efecto adicional sobre la inactivación a corto plazo de la FbPasa que se reduce a menos del 20%.

Teniendo en cuenta que se había publicado que la FbPasa no se degradaba en una cepa carente de Hxk2 (Horak, J. *et al.*, 2002) examinamos si la inactivación observada se debía realmente a la degradación proteolítica de la enzima. En los resultados que muestra el análisis de western (fig. 18) se puede observar que en el primer minuto en el que tiene lugar la inactivación de la enzima por fosforilación no se aprecia degradación mientras que a partir del minuto 30 existe una disminución gradual de la cantidad de proteína capaz de reaccionar con el anticuerpo antiFbPasa que resulta consistente con la disminución de la actividad enzimática.



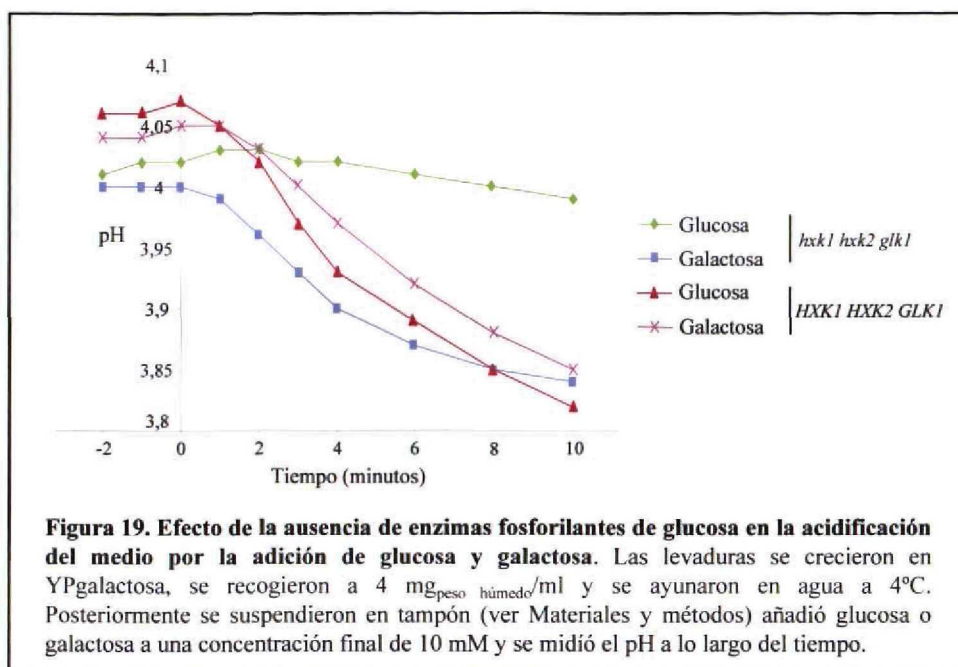
**Figura 18. Efecto de la ausencia de las hexoquinas 1 y 2 en la degradación de la proteína FbPasa.** Las levaduras se crecieron en YPetanol hasta la fase exponencial del crecimiento y se tomaron muestras antes (tiempo 0) y después de añadir glucosa a una concentración final del 2% a los tiempos indicados. La realización del western y los anticuerpos anti-FbPasa utilizados se describen en Materiales y métodos.

### 5.2.7. Activación de la ATPasa de membrana.

Con el fin de comprobar si la fosforilación de la glucosa es necesaria para la activación de la ATPasa de membrana realizamos un estudio comparativo de la activación de la bomba de protones por dos azúcares, glucosa y galactosa, en dos cepas, una silvestre para las tres enzimas fosforilantes y otra que carece de ellas.

Como se observa en la figura 19 la cepa silvestre precrecida en galactosa es capaz de acidificar el medio tras la adición tanto de glucosa como de galactosa, una medida indirecta de la activación de la ATPasa, mientras que la cepa incapaz de fosforilar la glucosa no acidifica prácticamente el medio en presencia de dicho azúcar, pero sí en respuesta a la galactosa.





### 5.3. Efecto de distintas fuentes de carbono no fermentables sobre la expresión de diversos genes sujetos a represión catabólica.

Hemos examinado la capacidad de la xilosa y otras fuentes de carbono no fermentables para producir represión catabólica en *S. cerevisiae*. Para ello hemos utilizado una cepa modificada por ingeniería genética ya que *S. cerevisiae* es incapaz de metabolizar pentosas. En esta cepa, TMB3001c, se encuentran integrados los genes *XYL1* y *XYL2* de *Pichia stipitis*, que codifican la xilosa reductasa y la xilitol deshidrogenasa respectivamente, y el gen *XKS1* de *S. cerevisiae* que codifica la xilulosa kinasa, todos ellos bajo el control del promotor del gen *PGK1* que codifica la fosfoglicerato kinasa (ver figura 5).

#### 5.3.1. Desrepresión de enzimas gluconeogénicas, glutámico deshidrogenasa, galactoquinasa e invertasa.

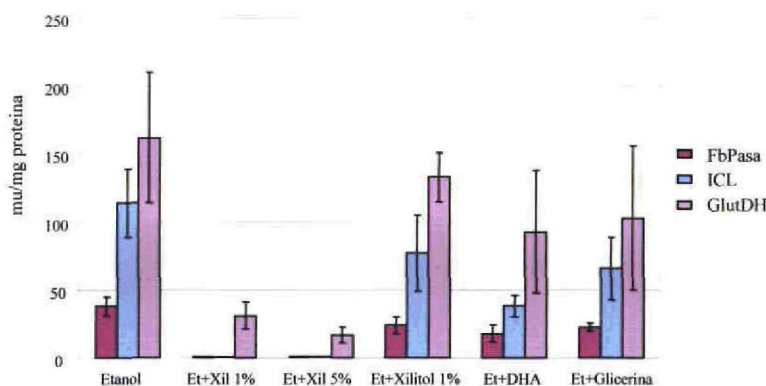
Para estudiar cómo afecta a la desrepresión de las enzimas seleccionadas la presencia en el medio de las distintas fuentes de carbono de estudio, primero se crecieron las levaduras en glucosa y después las células reprimidas fueron

resuspendidas en diferentes medios de desrepresión/inducción (según se describe en el apartado 4.3.2.) en presencia de las fuentes de carbono examinadas.

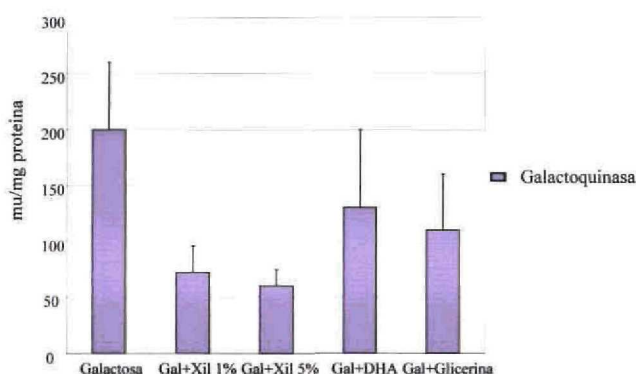
Los resultados de las medidas enzimáticas que se muestran en la figura 20 permiten concluir que la xilosa bloquea completamente la desrepresión de las enzimas FbPasa e ICL y disminuye fuertemente la desrepresión de GlutDH. El efecto de la xilosa en la inducción de la galactoquinasa e invertasa es más débil: los niveles de galactoquinasa disminuyen unas 3 veces al añadir xilosa al medio tanto al 1% como al 5% con respecto a las medidas en presencia de galactosa sola (fig. 21), mientras que la inducción de la invertasa a baja concentración de glucosa no fue afectada por xilosa al 1% pero disminuyó unas 4 veces en presencia de xilosa al 5% (fig. 22). La represión por xilitol de las enzimas FbPasa, ICL y GlutDH fue limitada, entre un 30-40% con respecto al control de desrepresión en etanol (fig. 20).

Analizamos también el efecto de fuentes de carbono gluconeogénicas como la glicerina o la dihidroxiacetona, sobre la desrepresión de diversas enzimas. Observamos que causan cierta interferencia con la desrepresión observada en presencia de etanol y galactosa con una disminución de los niveles de actividad enzimática entre un 35-65% (figuras 20 y 21).

Sin embargo estas fuentes de carbono no tuvieron ningún efecto en la desrepresión de la invertasa (fig. 22).

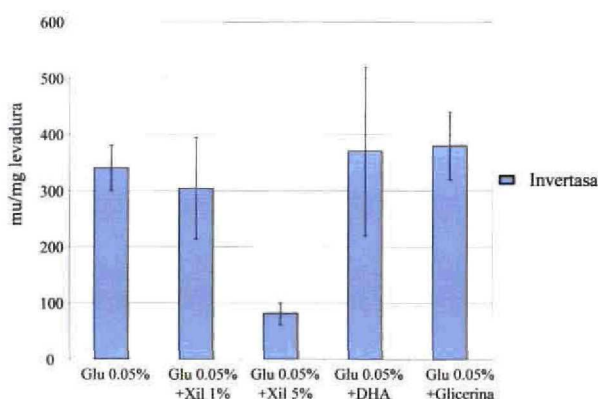


**Figura 20. Efecto de diferentes fuentes de carbono no fermentables en la desrepresión de las enzimas FbPasa, ICL y GlutDH.** La cepa de *S. cerevisiae* TMB3001c fue crecida en YPglucosa y desreprimida durante 6 horas en presencia de las fuentes de carbono indicadas en cada caso, tal y como se describe en el apartado 4.3.2. Los datos son la media de al menos 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estandar. Et = Etanol; Xil = Xilosa; DHA = Dihidroxiacetona.



**Figura 21. Efecto de diferentes fuentes de carbono no fermentables en la desrepresión de la galactokinasa.** La cepa de *S. cerevisiae* TMB3001c fue crecida en YPglucosa y desreprimida durante 5 horas en presencia de las fuentes de carbono indicadas en cada caso, tal y como se describe en el apartado 4.3.2. Los datos son la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estandar. Gal = Galactosa; Xil = Xilosa; DHA = Dihidroxiacetona.

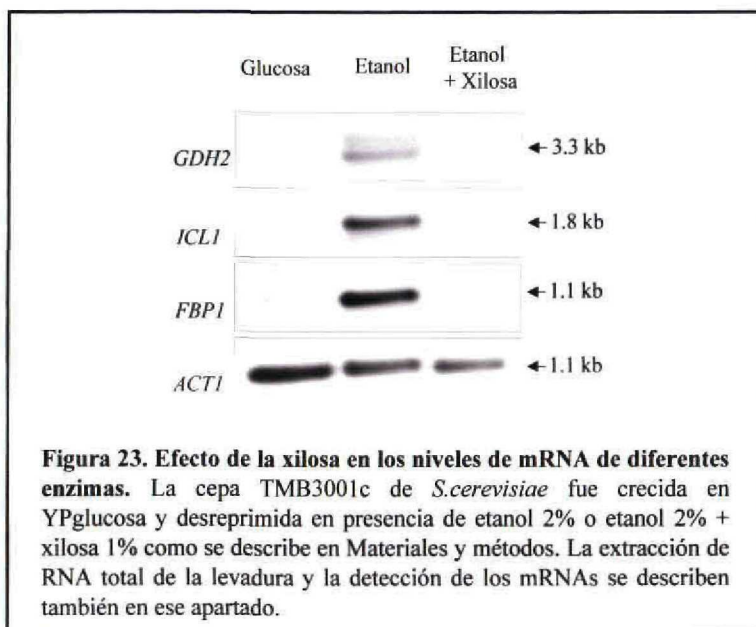
**Figura 22. Efecto de diferentes fuentes de carbono no fermentables en la desrepresión de la invertasa.** La cepa de *S. cerevisiae* TMB3001c fue crecida en YPglucosa y desreprimida durante 3 horas en presencia de las fuentes de carbono indicadas en cada caso, tal y como se describe en el apartado 4.3.2. Los datos son la media de al menos 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estandar. Glu = Glucosa; Xil = Xilosa; DHA = Dihidroxiacetona.



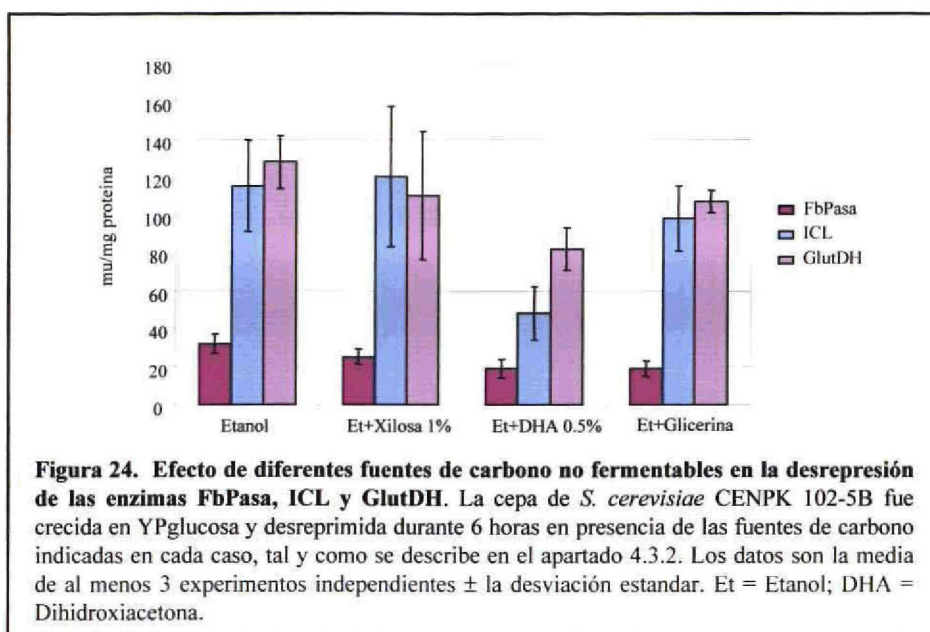
Con el fin de comprobar si en la cepa TMB3001c la baja actividad de la FbPasa, ICL y GlutDH observada en presencia de xilosa está asociada con bajos niveles de los correspondientes mRNAs, hemos realizado un análisis de northern. Se comprueba que en extractos de células reprimidas los niveles de mRNAs son indetectables y que la



adición de xilosa al medio de desrepresión bloquea la síntesis de los mensajeros medidos (fig. 23).



Para evaluar en que medida la represión causada por la xilosa es dependiente de su metabolismo, investigamos el efecto de la xilosa en la levadura CENPK 102-5B, que tiene el mismo fondo genético que la cepa TMB3001c, pero no es capaz de utilizar la xilosa. Se comprobó que la xilosa no produce efectos significativos, mientras que los efectos de la glicerina y de la dihidroxiacetona fueron similares en esta cepa y en la TMB3001c (fig. 24).



### 5.3.2. Niveles de actividad de diversas enzimas durante el crecimiento.

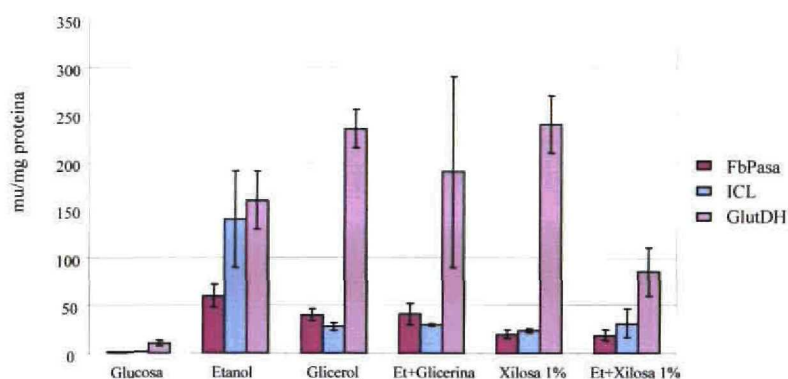
Se ha examinado también el efecto de las distintas fuentes de carbono sobre la represión catabólica durante el crecimiento de la levadura, comparando los niveles de enzimas en un medio que contenía la fuente de carbono desrepresora o una fuente de carbono potencialmente represora, o una mezcla de ambas.

Las actividades de las enzimas estudiadas son muy similares en glicerol, o en una mezcla de glicerol y etanol. Como se observa en la figura 25 para la isocitrato liasa, la actividad enzimática fue mucho más baja en estos medios que la observada durante el crecimiento en etanol, la disminución de la actividad FbPasa fue sólo de un 30% y la actividad de la GlutDH podría ser incluso más alta. La xilosa, tanto sola como junto con el etanol, permite una desrepresión parcial de la FbPasa y de la ICL (aproximadamente un 30% y un 20% respectivamente de la observada en levaduras crecidas en etanol). Curiosamente, la desrepresión de la GlutDH fue total durante el crecimiento en xilosa alcanzándose los mismos niveles que en glicerina, mientras que en una levadura crecida en una mezcla de xilosa y etanol, la actividad de la GlutDH fue de 2 a 3 veces más baja que en levaduras crecidas en un medio con cualquiera de estas fuentes de carbono.

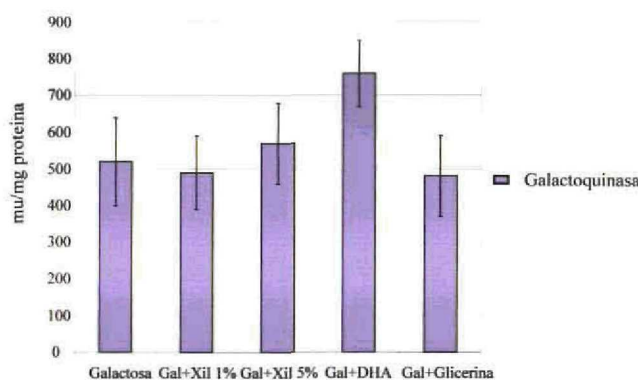
Ni la xilosa, al 1% o al 5%, ni la dihidroxiacetona o la glicerina disminuyeron la actividad de la galactoquinasa durante el crecimiento en galactosa (fig. 26).

Para desreprimir la invertasa, crecimos la levadura en rafinosa, ya que durante el crecimiento en sacarosa se observaron niveles muy bajos de actividad enzimática. (fig. 27). La adición de 1% ó 5% de xilosa causaba una reducción de la actividad invertasa (un 25% y 60% respectivamente), mientras que el crecimiento en xilosa sólo permitía una desrepresión parcial de la invertasa.



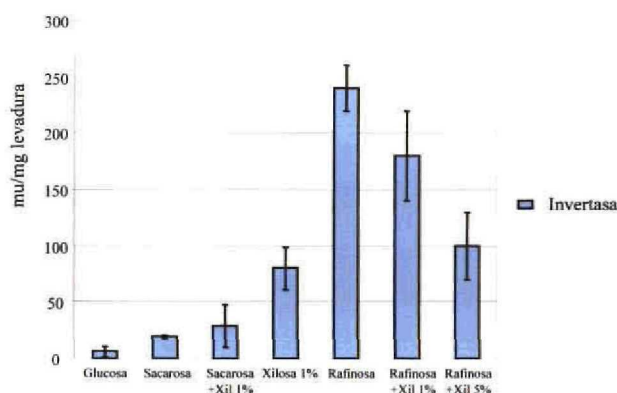


**Figura 25. Efecto de diferentes fuentes de carbono no fermentables en los niveles de las enzimas FbPasa, ICL y GlutDH durante el crecimiento.** La cepa de *S. cerevisiae* TMB3001c fue crecida en medio rico (YP) en presencia de las fuentes de carbono indicadas en cada caso, tal y como se describe en el apartado 4.3.2 y recogida durante la fase exponencial del crecimiento. Los datos son la media de al menos 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estandar. Et = Etanol.



**Figura 26. Efecto de diferentes fuentes de carbono no fermentables en los niveles de galactoquinasa durante el crecimiento.** La cepa de *S. cerevisiae* TMB3001c fue crecida en medio rico (YP) en presencia de las fuentes de carbono indicadas en cada caso, tal y como se describe en el apartado 4.3.2 y recogida durante la fase exponencial del crecimiento. Los datos son la media de al menos 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estandar. Gal = Galactosa; Xil = Xilosa; DHA = Dihidroxiacetona.

**Figura 27. Efecto de diferentes fuentes de carbono no fermentables en los niveles de invertasa durante el crecimiento.** La cepa de *S. cerevisiae* TMB3001c fue crecida en medio rico (YP) en presencia de las fuentes de carbono indicadas en cada caso, tal y como se describe en el apartado 4.3.2 y recogida durante la fase exponencial del crecimiento. Los datos son la media de al menos 3 experimentos independientes  $\pm$  la desviación estandar. Xil = Xilosa.



### 5.3.3. Falta de correlación entre represión de la FbPasa y niveles intracelulares de hexosas fosfato.

Para explorar una posible correlación entre el grado de represión catabólica producido por las distintas fuentes de carbono utilizadas en los experimentos anteriores y la concentración de algún metabolito intracelular que pudiera desempeñar un papel regulador en el proceso se midieron los niveles de dos intermediarios glicolíticos clave que se acumulan en la levadura crecida en glucosa. Como puede observarse en la tabla 13 aunque la concentración tanto de glucosa-6-P como de fructosa-1,6-bisfosfato es más baja cuando la levadura crece en xilosa que cuando crece en etanol o glicerina, la FbPasa está sólo parcialmente desreprimida en estas condiciones.

**Tabla 13. Ausencia de correlación entre la represión de la FbPasa y los niveles intracelulares de hexosas fosfatos.**

Fuente de carbono	Glucosa-6-P (mM)	Fructosa 1,6-P <sub>2</sub> (mM)	FbPasa (mU/mg proteína)
Glucosa 2%	0.94 ± 0.06 (4)	3.0 ± 0.2 (4)	≤1
Xilosa 1%	0.34 ± 0.01 (2)	<0.1 (2)	20
Glicerina 3%	0.56 ± 0.06 (2)	0.16 ± 0.06 (2)	40
Etanol 2%	0.48 ± 0.07 (5)	0.10 ± 0.06 (5)	60

La cepa TMB3001c de *S.cerevisiae* fue crecida en medio rico (YP) con las fuentes de carbono indicadas. Para determinar los niveles intracelulares de metabolitos, la levadura se recogió en la fase exponencial del crecimiento y los extractos se realizaron como se indica en el apartado 4.3.3. Los datos de actividad de la FbPasa provienen de la figura 25.

## ***6. DISCUSIÓN.***



En este trabajo hemos comprobado que los sensores Snf3 y Rgt2, además de desempeñar un papel central en el control de la expresión de los genes *HXT* (Özcan, S. *et al.*, 1996, Özcan, S. *et al.*, 1997, Özcan, S. *et al.*, 1998), afectan a diversos procesos regulados por glucosa en la levadura. Por otra parte hemos mostrado que el sensor Gpr1 no solo participa en la activación de la adenilato ciclasa provocada por glucosa (Rolland, F. *et al.*, 2000) sino que en su ausencia disminuyen los niveles máximos de invertasa o se enlentece la inactivación catabólica de la FbPasa.

Hemos confirmado que Snf3 y Rgt2 no son necesarios para que se produzca la represión catabólica sino que se requieren sólo en la medida en que permiten la expresión de los transportadores de glucosa, ya que su falta se compensa por la interrupción de *MTH1* (este trabajo, Schmidt, M. C. *et al.*, 1999, Lafuente, M. J. *et al.*, 2000) o por la sobreexpresión de *HXT1* (Özcan, S., 2002). Por otra parte, ni la falta de Gpr1, ni la ausencia simultánea de los tres sensores de membrana (en una cepa *mth1*) modifican la represión por glucosa de las enzimas estudiadas, tanto durante el crecimiento como en la transición gluconeogénesis-glicolisis. Teniendo en cuenta que el papel principal de Gpr1 parece ser el modular los niveles de cAMP durante esa transición de gluconeogénesis a glicólisis (Kraakman, L. *et al.*, 1999), estos resultados son consistentes con datos anteriores que indicaban que el control por cAMP de la expresión de ciertas enzimas sujetas a represión catabólica es parcialmente redundante con otros mecanismos de regulación (Zaragoza, O. *et al.*, 1999, Zaragoza, O. y Gancedo, J. M., 2001).

Resulta interesante comparar esta situación en *S. cerevisiae* con la que se da en la levadura de fisión *S. pombe*. En esta última levadura cualquier mutación que interfiera con la activación de la adenilato ciclasa o de la protein quinasa dependiente de cAMP anula la represión por glucosa de genes como *fbp1* (Hoffman, C. S. y Winston, F., 1990, Byrne, S. M. y Hoffman, C. S., 1993, Welton, R. M. y Hoffman, C. S., 2000). En particular en *S. pombe* se ha identificado la proteína Git3 cuya homología de secuencia con Gpr1 es solo parcial pero es un homólogo funcional de este sensor y se ha comprobado que la delección del gen *git3* elimina la represión de *fbp1* por glucosa (Welton, R. M. y Hoffman, C. S., 2000). Las diferencias en los mecanismos de regulación por glucosa de las dos levaduras contrastan con el hecho de que las vías

para el metabolismo de la glucosa están en general muy conservadas, lo que sugeriría que los circuitos de control se desarrollaron con posterioridad a la divergencia entre *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*. De hecho, si comparamos la situación en levaduras con la de otros organismos las diferencias son todavía más acusadas. Por ejemplo en *Escherichia coli* y en células de mamífero la concentración de cAMP disminuye cuando hay glucosa disponible, en lugar de aumentar como ocurre en levaduras (Gancedo, C. y Gancedo, J. M., 1985). En *E. coli* el cAMP se requiere para la inducción de genes reprimidos por glucosa (Ullmann, A., 1985) y en hígado de rata una concentración elevada de cAMP es una condición necesaria, aunque no suficiente, para la inducción de una enzima gluconeogénica como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Pilkis, S. J. y Granner, D. K., 1992).

Los resultados que hemos obtenido indican que los sensores Snf3/Rgt2 y Gpr1 tienen cierta importancia para la inducción por baja concentración de glucosa de una enzima como la invertasa. En un mutante *snf3 rgt2 mth1* el nivel de inducción de la invertasa por bajas concentraciones de glucosa alcanza solo un 50% del que se produce en la cepa silvestre correspondiente y lo mismo ocurre en un mutante *gpr1*. El efecto de las mutaciones en los distintos sensores es aditivo ya que en el mutante carente de los tres la expresión baja a un 30% de la medida en la cepa silvestre. Mientras que no existía información previa sobre el efecto de Gpr1 sobre la expresión de invertasa, los datos publicados sobre los efectos de la falta de Snf3 y Rgt2 eran a veces contradictorios. La mutación *snf3* se identificó inicialmente como causante de un fenotipo de incapacidad para fermentar la sacarosa (sucrose non-fermenting) y se describió que inhibía muy fuertemente la expresión del gen *SUC2* (Neigeborn, L. y Carlson, M., 1984). Sin embargo posteriormente se comprobó que una delección del gen *SNF3* no afectaba significativamente la desrepresión de la invertasa (Neigeborn, L. *et al.*, 1986, Schmidt, M. C. *et al.*, 1999), aunque en otro trabajo en el que se seguía la expresión de un gen de fusión *SUC2-lacZ* la delección de *SNF3* causaba una disminución del 80% en la actividad  $\beta$ -galactosidasa medida en condiciones de desrepresión (Özcan, S. *et al.*, 1997). En un doble mutante *snf3 rgt2* también parecen obtenerse datos discrepantes según se mida la actividad invertasa o la expresión del gen *SUC2-lacZ*. En el primer caso la desrepresión a baja glucosa es muy escasa, 5-



10% de la observada en una cepa silvestre (Schmidt, M. C. *et al.*, 1999, Lafuente, M. J. *et al.*, 2000), mientras que en el segundo la falta de Snf3/Rgt2 solo disminuye la desrepresión 2-3 veces (Özcan, S. *et al.*, 1998, Özcan, S., 2002). Si en un mutante *snf3rgt2* se interrumpe también *MTH1* para permitir un transporte eficaz de la glucosa, la invertasa se desreprime mejor pero también hay diferencias entre los datos de distintos grupos. En un caso la cantidad de invertasa a baja glucosa es incluso mayor que la de una cepa silvestre y a glucosa alta solo está reprimida unas 3 veces (Schmidt, M. C. *et al.*, 1999); en el otro la expresión a baja glucosa es un 60-70% de la medida en una cepa silvestre y la glucosa alta reprime unas 15 veces (Lafuente, M. J. *et al.*, 2000). Nuestros resultados son consistentes con estos últimos y los cambios que observamos en la actividad invertasa se correlacionan bien con los que se producen en los niveles del mRNA de *SUC2*. La cuestión que se puede plantear es si el efecto de Snf3/Rgt2 sobre la expresión de *SUC2* es directo o indirecto. Un efecto directo podría estar relacionado con el hecho de que en el promotor de *SUC2* se encuentra un sitio ligante para Rgt1 (Hazbun, T. R. y Fields, S., 2002), una proteína represora que interacciona con los promotores de los genes *HXT* y cuyo efecto se contrarresta por la unión de la glucosa a Snf3 y Rgt2 como se comentó en la introducción. Mas difícil resulta entender la posible función de Gpr1 en la inducción de la invertasa, puesto que esta se lleva a cabo a una concentración de glucosa 2-3 mM y se ha descrito que Gpr1 tiene baja afinidad para la glucosa,  $K_a$  aparente 25-75 mM (Rolland, F. *et al.*, 2000).

A diferencia de lo que ocurre con la invertasa, los sensores de membrana tienen muy poca influencia en la inducción de Pdc por glucosa. En cambio hemos confirmado el requerimiento absoluto de Snf3/Rgt2 para la expresión de *HXT1-lacZ* a concentración elevada de glucosa (Schmidt, M. C. *et al.*, 1999, Lafuente, M. J. *et al.*, 2000), y mostrado la dispensabilidad de Gpr1 para esta expresión. Estos resultados indican que incluso dos procesos aparentemente similares como inducción por alta glucosa de una enzima glicolítica y de un transportador de glucosa no se regulan por idénticos mecanismos.

Otro proceso que hemos estudiado es la inactivación de FbPasa provocada por glucosa. Ninguno de los sensores afecta significativamente al proceso inicial de inactivación rápida, debida a la fosforilación de la enzima. En el caso de Gpr1 esto



puede resultar sorprendente ya que la fosforilación de la FbPasa la lleva a cabo una protein kinasa dependiente de cAMP (Rittenhouse, J. *et al.*, 1987) y se sabe que Gpr1 tiene un papel importante en el aumento de la concentración intracelular de cAMP cuando se añade glucosa a una levadura desreprimida. Sin embargo hay que tener en cuenta que en ausencia de Gpr1 la subida en el nivel de cAMP es menor pero no se bloquea totalmente (Kraakman, L. *et al.*, 1999). Presumiblemente un pequeño aumento en la concentración de cAMP es suficiente para permitir la fosforilación de la FbPasa en esas condiciones metabólicas. Si faltan, a la vez, Gpr1 y las enzimas fosforilantes de glucosa el aumento en la concentración de cAMP no tiene lugar (Rolland, F. *et al.*, 2000) y en una cepa mutante con estas características hemos encontrado, de acuerdo con la predicción, una reducción importante en la magnitud de la inactivación rápida.

La inactivación irreversible de la FbPasa que desencadena la adición de glucosa a una levadura desreprimida sufre un ligero retraso tanto en un mutante carente de Snf3/Rgt2 como en un mutante *gpr1*. Como no se conoce ningún elemento que correlacione directamente los sensores con la reacción de degradación de la FbPasa, bien ocurra esta en la vacuola o en el proteasoma, sugerimos que el efecto observado es debido a un efecto indirecto de la falta de sensores sobre el metabolismo de la glucosa. Es interesante hacer notar que los efectos de la falta de Snf3/Rgt2 y Gpr1 resultan sinérgicos, a diferencia de lo que ocurría en el caso de la inducción de la invertasa, en la que los efectos eran aditivos. Aunque se ha publicado que las mutaciones individuales *snf3* y *rgt2* no producen ningún efecto sobre la proteólisis de FbPasa inducida por glucosa, los autores no examinaron lo que ocurría en un doble mutante (Horak, J. *et al.*, 2002). En ese trabajo también se concluía que la inactivación por proteólisis de FbPasa es independiente de Gpr1. Sin embargo, al estudiar el análisis de western correspondiente parecería más bien que la degradación de la FbPasa está algo retrasada en un mutante *gpr1*, lo que coincide con nuestros resultados.

Por último, en nuestras condiciones, no hemos observado efecto de la falta de Snf3/Rgt2 y/o Gpr1 sobre la acidificación del medio inducida por glucosa, que resulta de la activación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática. Mientras que se llevaba a cabo este trabajo aparecieron unos artículos en los que se observaba la no esencialidad

de Gpr1 para la activación de la  $H^+$ -ATPasa, aunque la falta de la proteína G, Gpa2, asociada a Gpr1 si disminuía la velocidad de salida de protones al medio (Souza, M. A. *et al.*, 2001, Kotyk, A. *et al.*, 2003). Esto podría indicar que Gpa2 puede regularse de forma independiente de Gpr1. El hecho de que otros autores hayan observado una menor acidificación en un mutante *snf3 rgt2* (Souza, M. A. *et al.*, 2001) no resulta sorprendente, ya que en ausencia de la mutación supresora *mth1* este mutante no metaboliza bien la glucosa como se discutió anteriormente. Lo que no se explica es por qué un mutante *snf3* (pero no un *rgt2*) también muestra una acidificación disminuída. Es posible que variaciones en el fondo genético de la levadura influyan en los resultados, ya que otro grupo ha observado que la mutación *snf3* causa inhibición de la acidificación en una cepa pero no en otra con distinto fondo genético (Kotyk, A. *et al.*, 2003). Este último grupo encuentra una acidificación incrementada en un doble mutante *snf3 rgt2*, un resultado que resulta difícil de interpretar.

En la levadura *Kluyveromyces lactis* existe un solo gen, *RAG4*, con una función equivalente a la de los genes *SNF3* y *RGT2*, que controla la expresión de los transportadores de glucosa de esta levadura (Betina, S. *et al.*, 2001). En un mutante *rag4* se alivia la represión producida por glucosa, lo que probablemente se explique por una reducción en la velocidad de consumo de la glucosa, pero hasta ahora no se ha descrito ningún otro efecto de la mutación *rag4*. Curiosamente, la levadura *S. pombe* no parece tener homólogos de *SNF3/RGT2* ni de *MTH1/STD1* aunque si existe un homólogo de *RGT1* (Heiland, S. *et al.*, 2000). Esto sugeriría que en *S. pombe*, filogenéticamente muy separada de *S. cerevisiae*, los transportadores de glucosa se encuentran regulados de forma muy distinta a los de esta última. Por otra parte en el proyecto Génolevures de genómica comparativa a gran escala (Feldmann, H., 2000) en la que se investigan numerosos hemiascomycetes se han identificado posibles homólogos de *SNF3/RGT2* en otras levaduras aunque no se ha comprobado aún su funcionalidad (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php>).

Teniendo en cuenta que hay evidencia de que la Hxk2 se necesita específicamente para la represión por glucosa de algunas enzimas, uno de nuestros objetivos ha sido examinar la función de esta enzima en diversos procesos controlados por glucosa. Entre las enzimas reprimidas por glucosa se observan interesantes



diferencias. La represión de la invertasa es totalmente dependiente de la Hxk2, la de las enzimas gluconeogénicas es la misma cualquiera sea la isoenzima presente y para la galactoquinasa y la glutámico deshidrogenasa se dan situaciones intermedias: máxima represión en una cepa con Hxk2, represión de 2 a 4 veces con Hxk1 y represión muy escasa en una cepa con Glk1. Es interesante notar que Hxk2 controla, a su vez, la expresión de los genes *HXK1* y *GLK1*: para que la transcripción de *HXK1-lacZ* sea reprimida por glucosa se requiere absolutamente Hxk2 y para *GLK1-lacZ* Hxk2 puede ser parcialmente suplido por Hxk1 (Rodríguez, A. *et al.*, 2001). Por otra parte hemos observado que la inducción de Pdc por glucosa no es total en una cepa de levadura que solo contiene Glk1, pero que no hay diferencias entre la cepa silvestre y cepas que contienen solo Hxk1 o Hxk2. Esto no se corresponde con los resultados de otro grupo que observa una menor actividad Pdc en una cepa *hxx2* (Diderich, J. A. *et al.*, 2001), quizás debido a las distintas condiciones de cultivo (medio mínimo vs. medio rico). Aunque se ha publicado que la Hxk2 se requiere para la degradación de la FbPasa inducida por glucosa (Horak, J. *et al.*, 2002), en nuestras condiciones esta degradación se produce normalmente en una cepa que sólo sintetiza la Hxk1 o la Glk1 y no tenemos en este momento una explicación para esta discrepancia.

Mientras que la Hxk2 es dispensable para muchos de los efectos de la glucosa, si la glucosa no puede ser fosforilada los cambios que produce en la levadura son muy reducidos. El efecto mas notable es la inducción de invertasa por alta glucosa en una cepa *hxx1 hxx2 glk1*, pero también observamos cierto nivel de inducción por glucosa del gen de fusión *HXT1-lacZ* en esa cepa. ¿Cómo podemos interpretar el papel particular de Hxk2 y el efecto más general de las enzimas que fosforilan glucosa? Se ha demostrado que durante el crecimiento en glucosa parte de la proteína Hxk2 se encuentra en el núcleo y que esta localización intranuclear es requerida para la represión de la invertasa (Herrero, P. *et al.*, 1998). Por otra parte se ha mostrado que Mig1 y Hxk2 interaccionan y que Mig1 se requiere para la retención de Hxk2 en el núcleo (Ahuatzi, D. *et al.*, 2004) y se ha propuesto que Hxk2 se requiere para la represión de ciertos genes porque forma parte del complejo represor que se une a determinados promotores a través de los dedos de zinc de Mig1. Sin embargo los efectos de las mutaciones *mig1* y *hxx2* sobre la represión por glucosa no son



equivalentes y es posible que la situación sea más compleja. Una levadura que expresa Hxk2 podría tener un metabolismo más activo de la glucosa que una cepa con solo Hxk1 o Glk1 y un patrón de metabolitos distinto. Mientras que la FbPasa, la ICL y la GlutDH siguen siendo sensibles a glucosa tanto en mutantes *mig1* como *hvk2* (este trabajo y P. Megina y J.M. Gancedo, resultados no publicados), se observa mucha menos represión de invertasa y de galactoquinasa en un mutante *hvk2* que en un mutante *mig1* (este trabajo, Nehlin, J. O. *et al.*, 1991, Lutfiyya, L. L. *et al.*, 1998). Para explicar estos resultados habría que suponer que el homólogo de Mig1, Mig2, que es responsable de la represión por glucosa de la invertasa en ausencia de Mig1 también debe estar complejoado con Hxk2 para ser operativo. Ésta es una cuestión que no ha sido examinada todavía. Un posible abordaje para una investigación posterior del papel específico de Hxk2 sería el uso de hexoquinasas heterólogas que no interaccionaran con Mig1.

En cualquier caso resulta bien establecido que la glucosa debe ser fosforilada, e incluso probablemente debe sufrir un metabolismo posterior (Boles, E. y Zimmermann, F. K., 1993), para llevar a cabo la mayoría de sus acciones: inducción de Pdc, activación de H<sup>+</sup>-ATPasa, inactivación de FbPasa. Esto sugiere que los efectos de la glucosa están mediados por cambios en la concentración de metabolitos intermediarios. Probablemente el patrón de estos metabolitos sea algo distinto según que las levaduras expresen una u otra de las enzimas fosforilantes de glucosa. La identificación del metabolito (o los metabolitos) capaz de actuar como señal sigue siendo una de las grandes cuestiones pendientes en este campo, como se comentará más adelante.

Otras fuentes de carbono también tienen que afectar al patrón de metabolitos intracelulares y en el curso de este trabajo hemos establecido que una variedad de fuentes de carbono son capaces de reprimir una diversidad de enzimas, en diferentes grados. El hecho de que diferentes enzimas examinadas no respondan de la misma forma a la presencia de fuentes de carbono represoras podría indicar que la señal represora no es la misma para los diferentes genes. Alternativamente el nivel de transcripción de los genes podría depender tanto de una señal general represora como de una señal inductora, la cual podría ser específica para diferentes grupos de genes.

Por ejemplo la isocitrato liasa parece requerir una fuente de carbono de 2 carbonos como el acetato o el etanol para estar totalmente inducida (Fernández, E. *et al.*, 1993, Belinchón, M. M. y Gancedo, J. M., 2003).

Una curiosa observación es el diferente efecto de las fuentes de carbono represoras en la desrepresión a corto plazo y durante el crecimiento de la levadura. Una posible interpretación es que la xilosa y otras fuentes de carbono estudiadas tengan sólo un efecto transitorio, como ocurre con el cAMP cuando se añade al medio de desrepresión (Zaragoza, O. *et al.*, 1999). Sin embargo, no parece ser este el caso, ya que enzimas como la FbPasa, la isocitrato liasa y la glutámico deshidrogenasa, en células de levadura resuspendidas en un medio que contiene etanol y xilosa están todavía reprimidas después de 24 horas (resultados no mostrados). La situación metabólica en condiciones de desrepresión, donde la levadura no se está multiplicando, no es equivalente a la que se da durante el crecimiento de la levadura. Una posible diferencia sería que algún metabolito inhibitorio se acumulara durante el crecimiento en glucosa y no pudiera ser degradado efectivamente en presencia de una fuente de carbono, como la xilosa, a menos que las levaduras estén creciendo. Para probar esta idea, ayunamos en agua durante una noche levaduras crecidas en glucosa y las desreprimimos en YPetanol en presencia o ausencia de xilosa. Observamos que, incluso en estas condiciones, la represión por xilosa fue mucho más fuerte que la observada en levaduras creciendo en YPetanol con xilosa al 1%. Una posibilidad es que la xilosa sea rápidamente degradada durante el crecimiento, pero hemos encontrado que incluso en condiciones donde la xilosa no tenía un efecto represor fuerte, la mayoría de la xilosa añadida permanecía presente en el medio. Nuestra conclusión es que el patrón de metabolitos intracelulares es muy variable, dependiendo de la fuente de carbono presente y de la presencia o ausencia de crecimiento, lo cual afecta a su vez a la velocidad de transcripción de genes sujetos a represión catabólica.

La xilosa entra en la vía de las pentosas fosfato a la altura de la xilulosa 5-P; luego la acción combinada de una pentosa fosfato isomerasa y una epimerasa junto con una transaldolasa y una transcetolasa proporcionan fructosa-6-P y gliceraldehído-3-P, dos intermediarios de la vía glicolítica. Sería esperable que los niveles intracelulares de las pentosas fosfato y de otros metabolitos intracelulares aumentaran



cuando la xilosa está presente en el medio, pero no hay datos sobre este punto. Nosotros hemos medido los niveles de glucosa-6-P y fructosa-1,6-bisfosfato, dos buenos candidatos para metabolitos reguladores (ver introducción) y hemos encontrado que durante el crecimiento en xilosa son por lo menos tan bajos como durante el crecimiento en glicerina o etanol, aunque la xilosa tenga un claro efecto represor. Esto apunta a otro(s) posible(s) metabolito(s) regulador(es) de la represión catabólica. Para identificarlos habrá que diseñar nuevas estrategias. Una de ellas podría ser usar análogos de la glucosa y mutantes afectados en distintos puntos del metabolismo de azúcares. Otra consistiría en poner a punto un sistema que permita medir un gran número de metabolitos intracelulares en la levadura, para llevar así a cabo una comparación global del “metaboloma” en distintas condiciones fisiológicas, intentando correlacionar determinados metabolitos con niveles de represión catabólica y también con otros efectos producidos por glucosa: inducción, activación o inactivación de diversas enzimas.

Los resultados que hemos discutido indican que existen distintos sistemas de señalización para diferentes procesos

1. Sistema dependiente de Snf3 y/o Rgt2, específico para glucosa (y probablemente fructosa). Tiene como diana el represor Rgt1. Se necesita para la inducción de transportadores de glucosa y permite máxima inducción de *SUC2*.

2. Sistema dependiente de Gpr1, específico para glucosa (y fructosa). Tiene como diana la adenilato ciclasa, Cyr1. Es importante para la transición gluconeogénesis-glicolisis. Tiene un efecto moderado sobre la inducción de *SUC2* y limitado sobre la inactivación de la FbPasa. No tiene efecto sobre otros procesos estudiados.

3. Sistema dependiente de Hxk2, específico para glucosa (y fructosa). Tiene como diana Mig1 (y quizás Mig2). Necesario para que haya represión por glucosa de algunos genes (*SUC2*, *HXK1*) y para que la represión de otros (*GAL1*, *GLK1*, *GDH2*) sea total.

4. Sistema dependiente del metabolismo de glucosa (o de otras fuentes de carbono). No están bien identificadas las distintas dianas. En su ausencia la glucosa alta puede inducir *SUC2* y parcialmente *HXT1*; en esas condiciones la glucosa también



produce un pequeño retraso en la inducción de enzimas gluconeogénicas. Se requiere para los demás efectos de la glucosa que se han investigado.

Aunque no se conoce en general a que proteínas afectarían los posibles metabolitos reguladores, en el caso de la represión catabólica lo esperable es que influyan sobre el estado de fosforilación de la proteína quinasa Snf1 y sobre la cantidad de esta proteína que se encuentra en el núcleo. Más específicamente los metabolitos podrían interaccionar con:

- las kinasas que fosforilan Snf1,
- la fosfatasa que desfosforila Snf1,
- importinas o exportinas nucleares,
- la proteína Snf1 misma (o alguna otra proteína del complejo Snf1), lo que modificaría la capacidad de Snf1 para ser (des)fosforilada y/o para unirse a importinas o exportinas.

Existen por lo tanto todavía muchos aspectos por explorar hasta que se consiga tener una visión de conjunto del sistema regulador controlado por niveles de metabolitos.

Una conclusión general de este trabajo es que no existe una vía única de señalización por glucosa y que los mecanismos de señalización resultan mas complejos de lo que se pensó en un principio. Distintos procesos desencadenados por la presencia de glucosa en el medio responden a diferentes señales producidas por la glucosa. Aunque hay señales que no han sido identificadas todavía, está comprobado que algunas vías de señalización dependen de receptores de glucosa en la membrana plasmática y otras involucran a la hexoquinasa 2 en su papel de proteína reguladora o a metabolitos intracelulares cuya concentración se modifica cuando se metaboliza la glucosa.

## ***7. CONCLUSIONES.***

- 1.- La falta de sensores de glucosa en la membrana plasmática o la falta de enzimas fosforilantes para dicho azúcar no causan los mismos efectos en distintos genes inducidos o reprimidos por glucosa.
- 2.- Los diversos procesos desencadenados por la glucosa en la levadura no responden a una señal única sino que están controlados por diferentes señales.
- 3.- Hemos identificado una variedad de fuentes de carbono no fermentables que pueden producir distintos grados de represión sobre una diversidad de enzimas.
- 4.- En levaduras crecidas en medios con distintas fuentes de carbono no se ha encontrado correlación entre el grado de represión de la FbPasa y los niveles intracelulares de glucosa-6-P y fructosa-1,6-bisfosfato.
- 5.- Se obtiene una mayor cantidad de mRNAs de levaduras recogidas por filtración rápida que de levaduras recogidas por centrifugación.



## *8. BIBLIOGRAFÍA.*

**Ahuatzi, D., Herrero, P., De La Cera, T. y Moreno, F.** (2004). The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J. Biol. Chem.* **279**: 14440-14446.

**App, H. y Holzer, H.** (1989). Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast *ABYSI* mutant. *J. Biol. Chem.* **264**: 17583-17588.

**Belinchón, M. M., Flores, C. y Gancedo, J.** (2004). Sampling *Saccharomyces cerevisiae* cells by rapid filtration improves the yield of mRNAs. *FEMS Yeast Research*. **4**: 751-756.

**Belinchón, M. M. y Gancedo, J. M.** (2003). The xylose and some non-sugar carbon sources cause catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **180**: 293-297.

**Bergmeyer, H. U.** (1983). Methods of enzymatic analysis, Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. y Grassl, M. eds. (Weinheim:Verlag Chemie).

**Betina, S., Goffrini, P., Ferrero, I. y Wesolowski-Louvel, M.** (2001). *RAG4* gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics*. **158**: 541-548.

**Birnboim, H.** (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**: 243-255.

**Blázquez, M. A., Lagunas, R., Gancedo, C. y Gancedo, J. M.** (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett.* **329**: 51-54.

**Bolano, A., Stinchi, S., Preziosi, R., Bistoni, F., Allegrucci, M., Baldelli, F., Martini, A. y Cardinali, G.** (2001). Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* **1**: 221-224.

**Boles, E. y Hollenberg, C. P.** (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 85-111.

**Boles, E., Muller, S. y Zimmermann, F.** (1996). A multi-layered sensory system controls yeast glycolytic gene expression. *Mol. Microbiol.* **19(3)**: 641-642.

**Boles, E. y Zimmermann, F. K.** (1993). Induction of pyruvate decarboxylase in glycolysis mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the concentrations of three-carbon glycolytic metabolites. *Arch. Microbiol.* **160**: 324-328.

**Byrne, S. M. y Hoffman, C. S.** (1993). Six git genes encode a glucose-induced adenylate cyclase activation pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **105**: 1095-1100.

**Cardini, C. E. y Leloir, L. F.** (1953). Enzymic phosphorylation of galactosamine and galactose. *Arch. Biochem. Biophys.* **45**: 55-64.

**Carlson, M.** (1999). Glucose repression in yeast. *Curr. Opinion Microbiol.* **2**: 202-207.

**Carlson, M. y Botstein, D.** (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5'ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell.* **28**: 145-154.

**Celenza, J. L. y Carlson, M.** (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science.* **233**: 1175-1180.

**Cereghino, G. P. y Scheffler, I. E.** (1996). Genetic analysis of glucose regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: control of transcription versus mRNA turnover. *EMBO J.* **15**: 363-374.



**Chiang, H. L. y Schekman, R.** (1991). Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature*. **350**: 313-318.

**Chomczynski, P. y Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

**Church, G. M. y Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **81**: 1991-1995.

**Collart, M. y Oliviero, S.** (1993). Preparation of yeast RNA. In: Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F., *et al.* (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, pp. 13.12.11-13.12.15. Wiley, New York.

**Conway, E. J. y Downey, M.** (1950). pH values of the yeast cell. *J. Biochem.* **47(3)**: 355-360.

**de la Cruz, B. J., Prieto, S. y Scheffler, I. E.** (2002). The role of the 5' untranslated region (UTR) in glucose-dependent mRNA decay. *Yeast*. **19**: 887-902.

**Derisi, J. L., Iyer, V. R. y Brown, P. O.** (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. **278**: 680-686.

**Diderich, J. A., Raamsdonk, L. M., Kruckeberg, A. L., Berden, J. A. y Van Dam, K.** (2001). Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1587-1593.

**Dixon, G. H. y Kornberg, H. L.** (1959). Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem. J.* **72**: 3P.

**Doherty, D.** (1970). L-glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods in Enzymology*. **17A**: 850-856.

**dos Passos, J. B., Vanhalewyn, M., Brandao, R. L., Castro, I. M., Nicoli, J. R. y Thevelein, J. M.** (1992). Glucose-induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affected in cAMP metabolism, cAMP-dependent protein phosphorylation and the initiation of glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1136**: 57-67.

**Dower, W. J., Miller, J. F. y Ragsdale, C. W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16(13)**: 6127-6145.

**Eberts, T. J., Sample, R. H., Glick, M. R. y Ellis, G. H.** (1979). A simplified, colorimetric micromethod for xylose in serum or urine, with phloroglucinol. *Clin. Chem.* **25**: 1440-1443.

**Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C. F. y Hahn-Hagerdal, B.** (2000). Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3381-3386.

**Eraso, P. y Portillo, F.** (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J. Biol. Chem.* **269**: 10393-10399.

**Feldmann, H.** (2000). Genolevures: a novel approach to 'evolutionary genomics'. *FEBS Lett.* **487**: 1-2.

**Fernández, E., Fernández, M., Moreno, F. y Rodicio, R.** (1993). Transcriptional regulation of the isocitrate lyase encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**: 238-242.

**Flick, K. M., Spielwoy, N., Kalashnikova, T. I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H. C. y Wittenberg, C.** (2003). Grr1-dependent inactivation of Mth1

mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from *HXT* gene promoters. *Mol. Biol. Cell.* **14**: 3230-3241.

**Funayama, S., Gancedo, J. M. y Gancedo, C.** (1980). Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur. J. Biochem.* **109**: 61-66.

**Gancedo, C. y Gancedo, J. M.** (1985). Phosphorylation of 3-O-methyl-D-glucose and catabolite repression in yeast. *Eur J Biochem.* **148**: 593-597.

**Gancedo, J., Clifton, D. y Fraenkel, D.** (1977). Yeast hexokinase mutants. *J. Biol. Chem.* **252**(13): 4443-4444.

**Gancedo, J. M.** (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334-361.

**Gancedo, J. M. y Gancedo, C.** (1971). Fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in fermenting and non-fermenting yeasts. *Arch. Microbiol.* **76**: 132-138.

**Gancedo, J. M. y Gancedo, C.** (1997). Gluconeogenesis and catabolite inactivation. In: Yeast sugar metabolism (Zimmermann, F. K. y Entian, K. D. (Eds.), Yeast sugar metabolism, pp. 359-377. Technomic Publishing Co., Lancaster-Basel.

**Gash, A.** (2002). Yeast genomic expression using DNA microarrays. *Methods Enzymol.* **350**, 393-414.

**Goldstein, A. y Lampen, J. O.** (1975).  $\beta$ -D-Fructofuranoside fructohydrolase from yeast. *Methods in Enzymology.* **42**: 504-511.



Goossens, A., de la Fuente, N., Forment, J., Serrano, R. y Portillo, F. (2000). Regulation of yeast H<sup>+</sup>-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell Biol.* **20**: 7654-7661.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. (Hanahan, D., (Eds). 109-135. Oxford, England.:IRL Press.

Hazbun, T. R. y Fields, S. (2002). A genome-wide screen for site-specific DNA-binding proteins. *Mol. Cell Proteomics.* **1**: 538-543.

Heiland, S., Radovanovic, N., Hofer, M., Winderickx, J. y Lichtenberg, H. (2000). Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **182**: 2153-2162.

Herrero, P., Galindez, J., Ruiz, N., Martinez-Campa, C. y Moreno, F. (1995). Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXK1*, *HXK2* and *GLK1* genes. *Yeast.* **11**: 137-144.

Herrero, P., Martínez-Campa, C. y Moreno, F. (1998). The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the *SUC2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters.* **434**: 71-76.

Hoffman, C. S. y Winston, F. (1990). Isolation and characterization of mutants constitutive for expression of the *fbp1* gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics.* **124**: 807-816.

Hoffman, C. S. y Winston, F. (1987). A ten-minutes DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene.* **57**: 266-272.

**Hohmann, S.** (1993). Characterization of *PDC2*, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 657-666.

**Hohmann, S.** (1991). Characterization of *PDC6*, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**: 7963-7969.

**Holmes, D. y Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**(1): 193-197.

**Hong, S. P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D. y Carlson, M.** (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**: 8839-8843.

**Horak, J., Regelman, J. y Wolf, D. H.** (2002). Two distinct proteolytic systems responsible for glucose-induced degradation of fructose-1,6-bisphosphatase and the Gal2p transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* share the same protein components of the glucose signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **277**: 8248-8254.

**Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J. A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J. K., Bumgarner, R., Goodlett, D. R., Aebersold, R. y Hood, L.** (2001). Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science.* **292**: 929-934.

**Ito, H., Fukada, Y., Murata, K. y Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.

**Jiang, R. y Carlson, M.** (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* **10**: 3105-3115.

**Johnston, M.** (1999). Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.* **15**: 29-33.

**Kang, J. J., Watson, R. M., Fisher, M. E., Higuchi, R., Gelfand, D. H. y Holland, M. J.** (2000). Transcript quantitation in total yeast cellular RNA using kinetic PCR. *Nucleic Acids Res.* **28**: e2.

**Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J. H. y Johnston, M.** (2004). Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell.* **3**: 221-231.

**Ko, C. H., Liang, H. y Gaber, R. F.** (1993). Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **13**(1) 638-648.

**Kotyk, A., Lapathitis, G. y Horak, J.** (2003). Critical findings on the activation cascade of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *FEMS Microbiol. Lett.* **12**: 175-180.

**Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W., Donaton, M. C., Van Dijck, P., Winderickx, J., De Winde, J. H. y Thevelein, J. M.** (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* **32**: 1002-1012.

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **15**: 680-685.

**Lafuente, M. J., Gancedo, C., Jauniaux, J. C. y Gancedo, J. M.** (2000). Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **35**: 161-172.

**Lakshmanan, J., Mosley, A. L. y Özcan, S.** (2003). Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1. *Curr. Genet.* **44**: 19-25.

**Lambert, M., Blanchin-Roland, S., Le Louedec, F., Lepingle, A. y Gaillardin, C.** (1997). Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of



extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3966-3976.

**Lindquist, S.** (1981). Regulation of protein synthesis during heat shock. *Nature*. **293**: 311-314.

**Lobo, Z. y Maitra, P. K.** (1977). Physiological role of glucose-phosphorylating enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **182(2)**: 639-645.

**Lombardo, A., Cereghino, G. P. y Scheffler, I. E.** (1992). Control of mRNA turnover as a mechanism of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **12**: 2941-2948.

**Lutfiyya, L. L., Iyer, V. R., Derisi, J., Devit, M. J., Brown, P. O. y Johnston, M.** (1998). Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **150**: 1377-1391.

**Mazón, M. J., Gancedo, J. y Gancedo, C.** (1982). Phosphorylation and inactivation of yeast fructose-bisphosphatase in vivo by glucose and by proton ionophores. A possible role for cAMP. *Eur. J. Biochem.* **127(3)**: 605-608.

**Mazón, M. J., Behrens, M. M., Portillo, F. y Pinon, R.** (1989). cAMP- and RAS-independent nutritional regulation of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1453-1460.

**Mercado, J. J., Smith, R., Sagliocco, F. A., Brown, A. J. y Gancedo, J. M.** (1994). The levels of yeast gluconeogenic mRNAs respond to environmental factors. *Eur. J. Biochem.* **224**: 473-481.

**Miller, J. H.** (1972). Experiments in molecular genetics. (Miller, J. H., (Eds.). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Moriya, H. y Johnston, M.** (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **10**: 1572-1577.

**Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M. y Sakai, A.** (2001). Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes and development.* **15**: 1217-1228.

**Nath, N., McCartney, R. R. y Schmidt, M. C.** (2003). Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol. Cell Biol.* **23**: 3909-3917.

**Nehlin, J. O., Carlberg, M. y Ronne, H.** (1991). Control of yeast *GAL* genes by *MIG1* repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.* **10**: 3373-3377.

**Nehlin, J. O. y Ronne, H.** (1990). Yeast *MIG1* repressor is related to the mammalian early growth response and Wilm's tumour finger proteins. *EMBO J.* **9**: 2891-2898.

**Neigeborn, L. y Carlson, M.** (1984). Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **108**: 845-858.

**Neigeborn, L., Schwartzberg, P., Reid, R. y Carlson, M.** (1986). Null mutations in the *SNF3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* cause a different phenotype than do previously isolated missense mutations. *Mol. Cell Biol.* **6**: 3569-3574.

**Newcomb, L. L., Diderich, J. A., Slattey, M. G. y Heideman, W.** (2003). Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eukaryotic cell.* **2**: 143-149.

Özcan, S. (2002). Two different signals regulate repression and induction of gene expression by glucose. *J. Biol. Chem.* **277**: 46993-46997.

Özcan, S., Dover, J. y Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**: 2566-2573.

Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wölf, S. y Johnston, M. (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 12428-12432.

Özcan, S. y Johnston, M. (1995). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell Biol.* **15**: 1564-1572.

Özcan, S. y Johnston, M. (1996). Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose. *Mol. Cell Biol.* **16**: 5536-5545.

Özcan, S., Vallier, L. G., Flick, J. S., Carlson, M. y Johnston, M. (1997). Expression of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast.* **13**: 127-137.

Papamichos-Chronakis, M., Gligoris, T. y Tzamarias, D. (2004). The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. *EMBO Rep.* **5**: 368-372.

Pilkis, S. J. y Granner, D. K. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 885-909.

Reifenberger, E., Boles, E. y Ciriacy, M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanism of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* **245**: 324-333.



**Rittenhouse, J., Moberly, L. y Marcus, F.** (1987). Phosphorylation in vivo of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase at the cyclic AMP-dependent site. *J. Biol. Chem.* **262**: 10114-10119.

**Rodriguez, A., de la Cera, T., Herrero, P. y Moreno, F.** (2001). The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **355**: 625-631.

**Rodríguez, C. y Gancedo, J. M.** (1999). Glucose signaling in yeast is partially mimicked by galactose and does not require the Tps1 protein. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **1**: 52-58.

**Rolland, F., De Winde, J., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J. y Winderickx, J.** (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol. Microbiol.* **38**(2): 348-358.

**Rolland, F., Winderickx, J. y Thevelein, J.** (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences.* **26**: 310-317.

**Rose, M., Albig, W. y Entian, K. D.** (1991). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII. *Eur. J. Biochem.* **199**: 511-518.

**Saez, M. J. y Lagunas, R.** (1976). Determination of intermediary metabolites in yeast. Critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels. *Mol. Cell Biochem.* **13**: 73-78.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., (Eds.). Cold Spring Harbor, N.Y., USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmidt, M. C., McCartney, R. R., Zhang, X., Tillman, T. S., Solimeo, H., Wölfl, S., Almonte, C. y Watkins, S. C. (1999). Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **19**: 4561-4571.

Schmitt, H. D., Ciriacy, M. y Zimmermann, F. K. (1983). The synthesis of yeast pyruvate decarboxylase is regulated by large variations in the messenger RNA level. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 247-252.

Schork, S. M., Thumm, M. y Wolf, D. H. (1995). Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Degradation occurs via the ubiquitin pathway. *J. Biol. Chem.* **370**: 26446-26450.

Schüller, H. J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **43**: 139-160.

Serrano, R. (1983). In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* **156**(1): 11-14.

Sherman, F. y Hicks, J. B. (1991). Micromanipulation and dissection of asci. *Methods Enzymol.* **194**: 21-37.

Singer, T. P. y Pensky, J. (1952). Isolation and properties of the carboxylase of wheat germ. *J. Biol. Chem.* **196**: 375-388.

Smith, F. C., Davies, S. P., Wilson, W. A., Carling, D. y Hardie, D. G. (1999). The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near regulatory domain 1. *FEBS Lett.* **453**: 219-223.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

**Souza, M. A., Tropia, M. J. y Brandao, R. L.** (2001). New aspects of the glucose activation of the H<sup>+</sup>-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **147**: 1849-1855.

**Sutherland, C. M., Hawley, S. A., McCartney, R. R., Leech, A., Stark, M. J., Schmidt, M. C. y Hardie, D. G.** (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr. Biol.* **13**: 1299-1305.

**Ter Linde, J. J., Liang, H., Davis, R. W., Steensma, H. Y., Van Dijken, J. P. y Pronk, J. T.** (1999). Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**: 7409-7413.

**Thevelein, J.** (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast*. **10(13)**: 1753-1790.

**Thomas, B. J. y Rothstein, R.** (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*. **56**: 619-630.

**Treitel, M. A., Kuchin, S. y Carlson, M.** (1998). Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **18**: 6273-6280.

**Tu, J. y Carlson, M.** (1995). *REG1* binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**: 5939-5946.

**Uesono, Y., Ashe, M. P. y Toh-E, A.** (2004). Simultaneous yet independent regulation of actin cytoskeletal organization and translation initiation by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 1544-1556.

**Ullmann, A.** (1985). Catabolite repression 1985. *Biochimie*. **67**: 29-34.



**Uno, I., Matsumoto, K., Adachi, K. y Ishikawa, T.** (1983). Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast. *J. Biol. Chem.* **258**: 10867-10872.

**Van Aelst, L., Hohmann, S., Bulaya, B., De Koning, W., Sierkstra, L., Neves, M. J., Luyten, K., Alijo, R., Ramos, J. y Coccetti, P.** (1993). Molecular cloning of a gene involved in glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **8**: 927-943.

**Van Solingen, P. y Van Der Plaat, J. B.** (1975). Partial purification of the protein system controlling the breakdown of trehalose in baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **62**: 553-560.

**Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Bassett, D. E. J., Hieter, P., Vogelstein, B. y Kinzler, K. W.** (1997). Characterization of the yeast transcriptome. *Cell.* **88**: 243-251.

**Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S. y Carlson, M.** (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.* **15**: 1104-1114.

**Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. y Philippsen, P.** (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **10**: 1793-1808.

**Warner, J. R.** (1989). Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **53**: 256-271.

**Welton, R. M. y Hoffman, C. S.** (2000). Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 galpha, the git5 Gbeta and the git3 putative glucose receptor. *Genetics.* **156**: 513-521.

**Wickner, R. B.** (1996). Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **60**: 250-265.

**Yin, Z., Hatton, L. y Brown, A. J. P.** (2000). Differential post-transcriptional regulation of yeast mRNAs in response to high and low glucose concentrations. *Mol. Microbiol.* **35**: 553-565.

**Yin, Z., Wilson, S., Hauser, N. C., Tournu, H., Hoheisel, J. D. y Brown, A. J.** (2003). Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. *Mol. Microbiol.* **48**: 713-724.

**Yun, C. W., Tamaki, H., Nakayama, R., Yamamoto, K. y Kumagai, H.** (1998). Gpr1p, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**: 29-33.

**Zaragoza, O. y Gancedo, J. M.** (2001). Elements from the cAMP signaling pathway are involved in the control of expression of the yeast gluconeogenic gene *FBP1*. *FEBS Lett.* **506**: 262-266.

**Zaragoza, O., Lindley, C. y Gancedo, J. M.** (1999). Cyclic AMP can decrease expression of genes subject to catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**: 2640-2642.

## ANEXO I.

**La recogida de muestras de levadura por filtración incrementa el rendimiento de los mRNAs en *Saccharomyces cerevisiae*.**

El análisis de cambios en la expresión génica en *Saccharomyces cerevisiae* como respuesta a diferentes estímulos o como consecuencia de mutaciones específicas, es un punto de interés para un gran número de laboratorios. Se han desarrollado una variedad de técnicas para llevar a cabo tales estudios: análisis de northern estándar, hibridación en serie (arrays) (Derisi, J. L. *et al.*, 1997), cinéticas de RT-PCR (Kang, J. J. *et al.*, 2000) o análisis seriados de expresión génica (SAGE) (Velculescu, V. E. *et al.*, 1997). Todos estos procedimientos tienen un primer paso en común, el aislamiento del RNA total de la levadura, y es esencial que durante este proceso los mRNAs presentes en las células vivas se mantengan intactos en la medida de lo posible.

Mientras que se han optimizado métodos para la extracción del RNA y ahora hay disponibles diversas técnicas adecuadas para ello (Chomczynski, P. y Sacchi, N., 1987, Collart, M. y Oliviero, S., 1993), no se ha prestado mucha atención al método utilizado para la recogida de muestras de levaduras. Normalmente las levaduras son recogidas por centrifugación, pero mientras unos protocolos recomiendan hacerlo en frío (Ter Linde, J. J. *et al.*, 1999), otros advierten de los posibles cambios en los niveles de mRNAs producidos como consecuencia del shock térmico (Gash, A., 2002). Incluso en un procedimiento que se cita con frecuencia (Lindquist, S., 1981) no se definen las condiciones de centrifugación. En el método descrito en la edición del 2003 del Current Protocols (Collart, M. y Oliviero, S., 1993) se indican 3 minutos de centrifugación a 4°C, y se apunta que “el tiempo y la velocidad de centrifugación no son críticos”. En algunos casos las levaduras son incluso lavadas con agua después de la centrifugación (Bolano, A. *et al.*, 2001, Ideker, T. *et al.*, 2001). Se ha propuesto la filtración de las levaduras como una posible alternativa a la centrifugación (Gash, A., 2002), pero no parece haberse examinado ambos métodos en paralelo.

La recogida de muestras por centrifugación no resulta lo suficientemente rápida para llevar a cabo estudios en los cuales se examinan cambios en la transcripción a



## ANEXO I.

**La recogida de muestras de levadura por filtración incrementa el rendimiento de los mRNAs en *Saccharomyces cerevisiae*.**

El análisis de cambios en la expresión génica en *Saccharomyces cerevisiae* como respuesta a diferentes estímulos o como consecuencia de mutaciones específicas, es un punto de interés para un gran número de laboratorios. Se han desarrollado una variedad de técnicas para llevar a cabo tales estudios: análisis de northern estándar, hibridación en serie (arrays) (Derisi, J. L. *et al.*, 1997), cinéticas de RT-PCR (Kang, J. J. *et al.*, 2000) o análisis seriados de expresión génica (SAGE) (Velculescu, V. E. *et al.*, 1997). Todos estos procedimientos tienen un primer paso en común, el aislamiento del RNA total de la levadura, y es esencial que durante este proceso los mRNAs presentes en las células vivas se mantengan intactos en la medida de lo posible.

Mientras que se han optimizado métodos para la extracción del RNA y ahora hay disponibles diversas técnicas adecuadas para ello (Chomczynski, P. y Sacchi, N., 1987, Collart, M. y Oliviero, S., 1993), no se ha prestado mucha atención al método utilizado para la recogida de muestras de levaduras. Normalmente las levaduras son recogidas por centrifugación, pero mientras unos protocolos recomiendan hacerlo en frío (Ter Linde, J. J. *et al.*, 1999), otros advierten de los posibles cambios en los niveles de mRNAs producidos como consecuencia del shock térmico (Gash, A., 2002). Incluso en un procedimiento que se cita con frecuencia (Lindquist, S., 1981) no se definen las condiciones de centrifugación. En el método descrito en la edición del 2003 del Current Protocols (Collart, M. y Oliviero, S., 1993) se indican 3 minutos de centrifugación a 4°C, y se apunta que “el tiempo y la velocidad de centrifugación no son críticos”. En algunos casos las levaduras son incluso lavadas con agua después de la centrifugación (Bolano, A. *et al.*, 2001, Ideker, T. *et al.*, 2001). Se ha propuesto la filtración de las levaduras como una posible alternativa a la centrifugación (Gash, A., 2002), pero no parece haberse examinado ambos métodos en paralelo.

La recogida de muestras por centrifugación no resulta lo suficientemente rápida para llevar a cabo estudios en los cuales se examinan cambios en la transcripción a

corto plazo, por lo que consideramos que la filtración rápida era el procedimiento más adecuado. Como prerrequisito para este tipo de estudio, hemos realizado una comparación detallada del patrón de RNA en extractos de levadura recogida por filtración rápida, o por centrifugación en frío o a temperatura ambiente. Mostramos que el rendimiento de los mRNAs es mucho mayor cuando la levadura se ha recogido por filtración rápida y ha sido congelada inmediatamente en nitrógeno líquido.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### - Cepas y condiciones de crecimiento.

Las cepas de levadura utilizadas están descritas en la tabla 1 del apartado 4.1 de Materiales y método correspondiente a esta tesis doctoral.

Los cultivos de levaduras se llevaron a cabo a 30°C en medio rico (YP) con glicerina 3% + etanol 2% (medio de desrepresión) o con glucosa 2% como fuente de carbono.

### - Recogida de muestras de levadura.

Se utilizaron diferentes sistemas para la toma de muestras y dos condiciones de almacenamiento de las mismas. El procedimiento usado en cada caso está indicado en las correspondientes figuras. En todos los casos las levaduras fueron recogidas en la fase exponencial del crecimiento (O.D.<sub>660 nm</sub> de 0.6, correspondiente a unos 2 mg<sub>peso húmedo</sub>/ml).

### - Filtración rápida.

Las muestras de cultivo de levadura (50-100 mg peso húmedo) se recogieron mediante filtración al vacío utilizando una membrana de nitrocelulosa (Millipore AAWP04700) en menos de 30 segundos. Inmediatamente la levadura filtrada se retiró mediante una espátula y se congeló en nitrógeno líquido, conservándose a -20°C o-



70°C en tubos Falcon hasta su procesamiento. Este procedimiento permite tomar varias muestras en unos pocos minutos.

- Centrifugación.

Muestras de cultivos de levadura equivalentes a las descritas en el apartado anterior se centrifugaron a 700g durante 4 min a 4°C o a temperatura ambiente; después de eliminar el sobrenadante las células se conservaron a -20°C o a -70°C, o se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C.

- Extracción de RNA.

La extracción del RNA total se realizó con fenol en presencia de isotiocianato de guanidino (Chomczynski, P. y Sacchi, N., 1987) usando el siguiente procedimiento: A la pella de levadura se añadieron 0.8 ml del reactivo comercial TRIzol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) frío y la suspensión resultante se transfirió a un tubo de microcentrífuga con 0.5 g de bolas de vidrio estériles, de 0.5mm de diámetro (pretratadas con ácido nítrico concentrado, lavadas a fondo con agua, e incubadas toda la noche en una estufa a 200°C). La suspensión se agitó durante 4 min en un vortex; después de 5 min a temperatura ambiente se añadieron 0.2 ml de alcohol cloroformo/isoamílico (24:1) y los tubos se agitaron vigorosamente con la mano. Después de 5 min en hielo, la suspensión se centrifugó a 7000g durante 15 min en frío. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, en donde se añadieron 0.5 ml de isopropanol, incubándose la mezcla durante 10 min en hielo y centrifugándola posteriormente a 11.000g durante 10 min en frío. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento resultante se lavó con 1 ml de etanol al 70% frío. Después de secar las muestras al vacío durante 5 min, el precipitado de RNA se disolvió en 50 µl de agua milli-Q. Una vez resuspendido y desnaturalizado 10 min a 65°C el RNA total, la cuantificación del mismo se llevó a cabo mediante la lectura de la absorbancia a  $A_{260nm}$ , teniendo en cuenta que 40 µg/ml de RNA de simple cadena tiene una absorbancia de 1



unidad a dicha longitud de onda. Además se comprobó que la razón  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  estaba alrededor de 1.9.

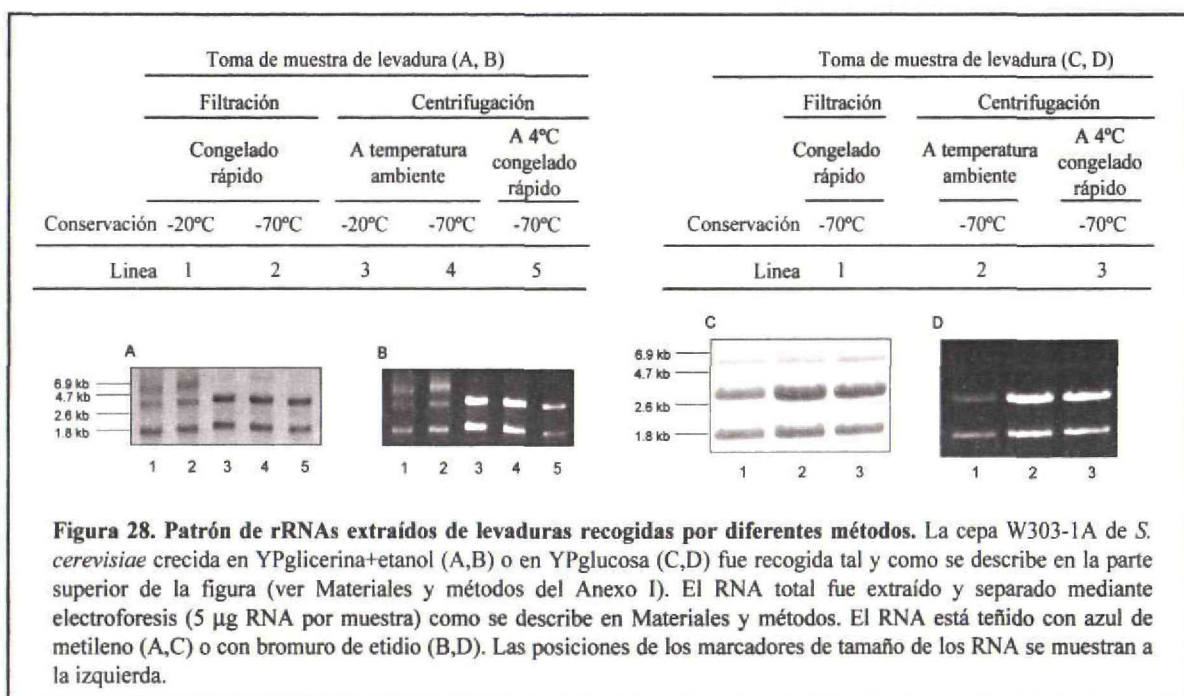
- Análisis de northern.

Las muestras de RNA se mezclaron con 3 volúmenes de tampón de carga (20 mM MOPS, pH 7, 8 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA, 2 M formaldehído, 12.6 M formamida y  $0.04 \text{ mg ml}^{-1}$  de bromuro de etidio), se calentaron a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 15 min y se enfriaron en hielo. Los RNAs se separaron en un gel de 2.2 M formaldehído/0.8% agarosa. El gel se lavó una vez con agua destilada estéril y dos veces con SSC 20X, durante 30 min cada vez. Los RNAs se transfirieron por capilaridad unidireccional en tampón SSC 20X a una membrana de nylon (Nitrán N, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) y se fijaron a la misma mediante dos ciclos de luz UV ( $120 \text{ mJ/cm}^2$ ) en un Stratalinker 2400 (Stratagene).

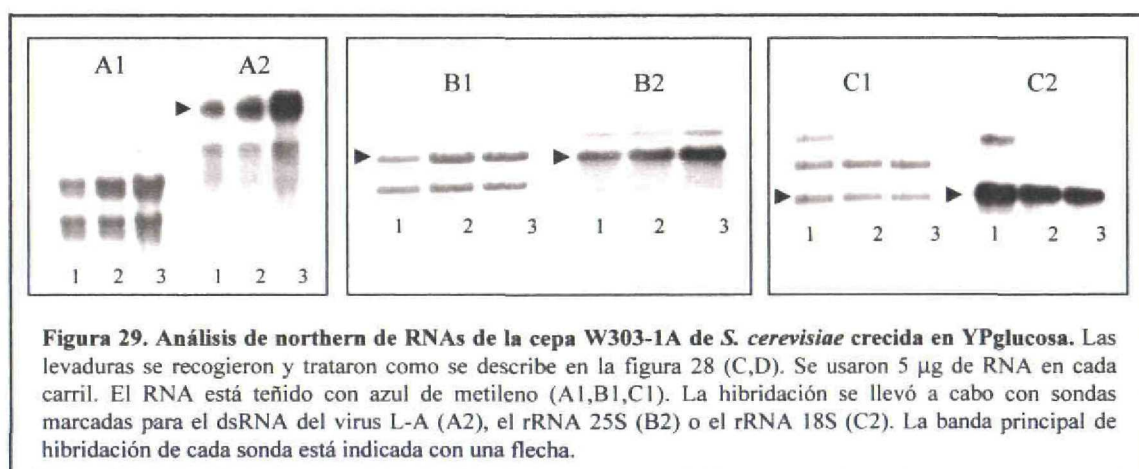
Para visualizar los RNAs la membrana se tiñó con una solución de azul de metileno 0.02% en 0.3M de acetato de sodio, pH 4.3. Tras desteñir la membrana con NaCl 20 mM,  $\text{Na H}_2\text{PO}_4$  2mM pH 7.4, EDTA 0.2 mM y SDS 1%, se realizó la hibridación con las sondas marcadas radiactivamente en tampón Church (Church, G. M. y Gilbert, W., 1984) a  $65^{\circ}\text{C}$  durante una noche. Las sondas usadas para *S.cerevisiae* y para *Y. lipolytica* se describen en la tabla 2 del apartado 4.5.6 de Materiales y métodos de esta tesis doctoral.

Las sondas se marcaron con  $^{32}\text{P}$  mediante el reactivo comercial REDIPRIME<sup>TM</sup>II y fueron purificadas usando las columnas NICK<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany).

La cuantificación de las señales obtenidas en las membranas de northern se realizó mediante densitometría utilizando un Instantimager (Packard, Boston, MA, USA).



**Figura 28. Patrón de rRNAs extraídos de levaduras recogidas por diferentes métodos.** La cepa W303-1A de *S. cerevisiae* crecida en YPglicerina+etanol (A,B) o en YPglucosa (C,D) fue recogida tal y como se describe en la parte superior de la figura (ver Materiales y métodos del Anexo I). El RNA total fue extraído y separado mediante electroforesis (5 µg RNA por muestra) como se describe en Materiales y métodos. El RNA está teñido con azul de metileno (A,C) o con bromuro de etidio (B,D). Las posiciones de los marcadores de tamaño de los RNA se muestran a la izquierda.



**Figura 29. Análisis de northern de RNAs de la cepa W303-1A de *S. cerevisiae* crecida en YPglucosa.** Las levaduras se recogieron y trataron como se describe en la figura 28 (C,D). Se usaron 5 µg de RNA en cada carril. El RNA está teñido con azul de metileno (A1,B1,C1). La hibridación se llevó a cabo con sondas marcadas para el dsRNA del virus L-A (A2), el rRNA 25S (B2) o el rRNA 18S (C2). La banda principal de hibridación de cada sonda está indicada con una flecha.

## RESULTADOS:

- Patrón de RNAs de muestras de *S. cerevisiae* recogidas por diferentes procedimientos.

Las muestras de la cepa W303-1A de *S. cerevisiae* crecida en un medio con glicerina + etanol como fuentes de carbono fueron recogidas tanto por filtración como por centrifugación, y conservadas a -20 o -70°C. La cantidad total de RNA extraído de las mismas fue similar (tabla 14) y los RNAs parecen mantener la misma integridad en todas las muestras (fig. 28: A y B). Se advierte, sin embargo, que en los extractos de las muestras filtradas (carriles 1-2) hay una banda destacada de aproximadamente 6 Kb., la cual es bastante más débil en los extractos de las levaduras centrifugadas (carriles 3-5). En los RNAs extraídos de las levaduras crecidas en glucosa también se puede observar esta banda (fig.28: C y D) pero constituye una pequeña porción del RNA total, incluso en extractos de muestras filtradas. Hemos considerado la posibilidad de que este RNA que tiene una movilidad electroforética menor que la banda del rRNA 25S podría corresponder al dsRNA del virus L-A que parece estar presente en la mayoría de las cepas de laboratorio (Wickner, R. B., 1996). Sin embargo, la hibridación con una sonda para este dsRNA produce una señal intensa a una distancia más cercana al origen, en una posición donde no había RNA visible después de la tinción con azul de metileno (fig. 29: A1 y A2). En cambio observamos que la banda de RNA visible de menor movilidad hibrida con la sonda para rRNA 25S usada como control de carga (fig. 29: B1 y B2), e investigamos si podría también unirse a la sonda para el rRNA 18S. Como se muestra en la figura 29 (C1 y C2) esta sonda se une al RNA de baja movilidad de forma específica, ya que no muestra ninguna interacción con el rRNA 25S. Por lo tanto que esta banda situada por encima del rRNA 25S, particularmente abundante en extractos de levaduras desreprimidas recogidas por filtración, podría corresponder al rRNA parcialmente procesado 32 o 33S (de aproximadamente 6 Kb.). Aparentemente este RNA es menos estable en levaduras recogidas por centrifugación.



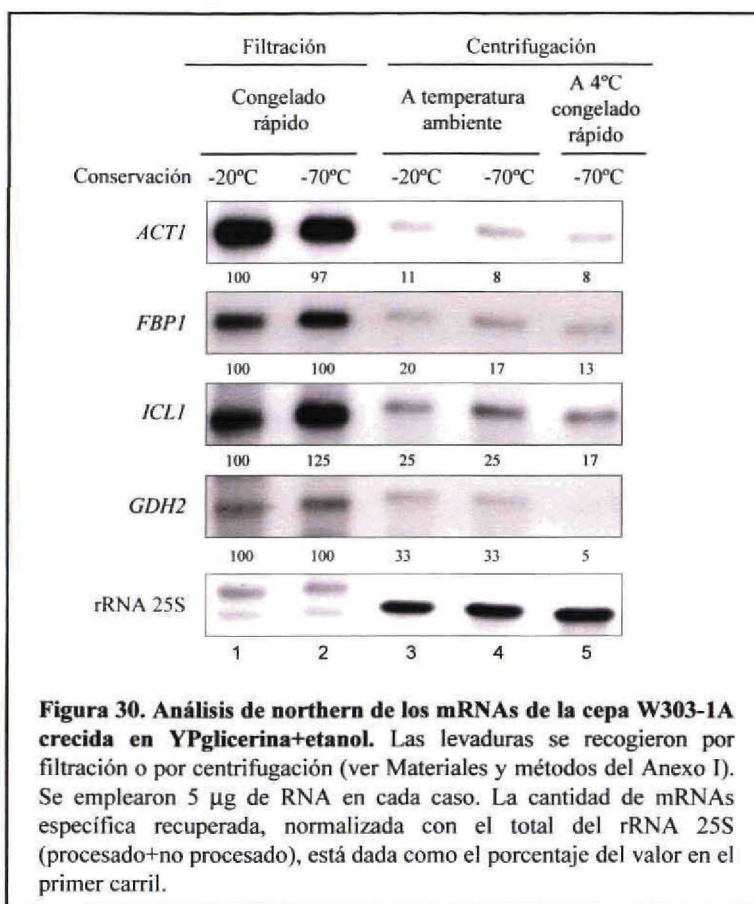
**Tabla 14. Rendimiento del RNA total de muestras de *S. cerevisiae* recogidas por diferentes procedimientos.**

Método de toma de muestra <sup>a</sup>	µg RNA (mg levadura) <sup>-1</sup>
Filtración/congelado rápido/conservación a -20°C	1.6 ± 0.4 (8)
Filtración/congelado rápido/conservación a -70°C	1.4 ± 0.4 (5)
Centrifugación a 22°C/conservación a -20°C	1.4 ± 0.6 (8)
Centrifugación a 22°C/conservación a -70°C	1.5 ± 0.5 (5)
Centrifugación a 4°C/congelado rápido/conservación a -70°C	1.4 ± 0.5 (5)

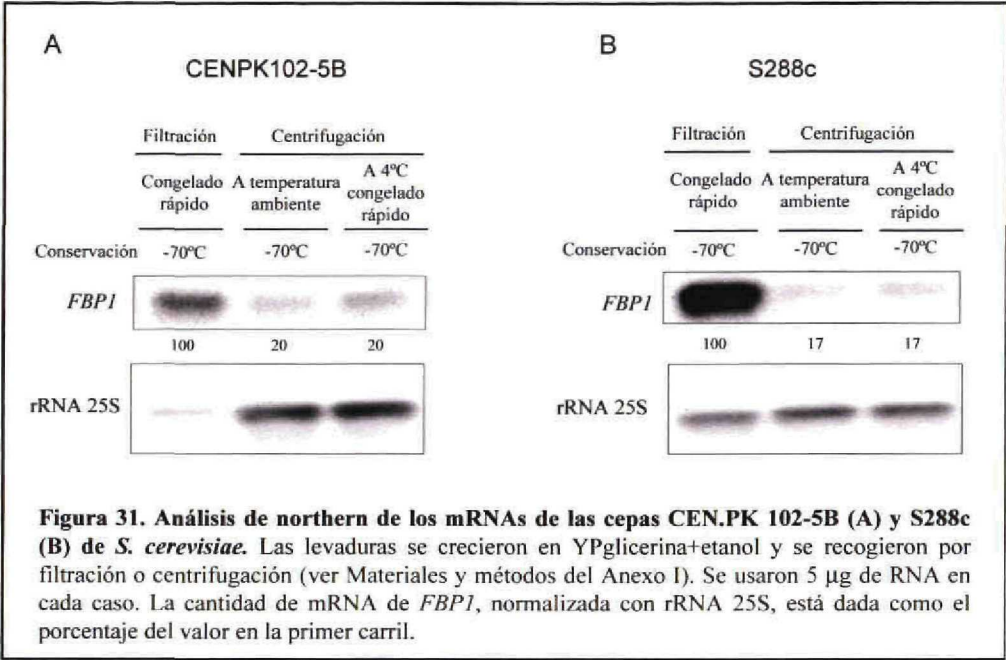
<sup>a</sup> El RNA se extrajo a partir de 50-100 mg peso húmedo de levadura, recogida y almacenada hasta su procesamiento como se indica en cada caso. La cuantificación se realizó como se indica en Materiales y métodos. El número de experimentos realizados se indica entre paréntesis.

- Efecto del método de la recogida de muestras de *S. cerevisiae* en el rendimiento del mRNA.

Para comparar los niveles de mRNAs recuperados de levaduras desreprimidas usando diferentes métodos de recogida, elegimos sondas de un gen que se expresa constitutivamente, *ACT1* (que codifica la actina), y de varios genes reprimidos fuertemente por glucosa, *FBP1*, *ICL1* y *GDH2*, (que codifican la fructosa-1,6-bisfosfatasa, la isocitrato liasa y la glutámico deshidrogenasa NAD<sup>+</sup>-dependiente, respectivamente). Como se muestra en la figura 30, en todos los casos el rendimiento de mRNA fue mucho mayor (de 3 a 10 veces) cuando el RNA fue extraído de levaduras recogida por filtración.

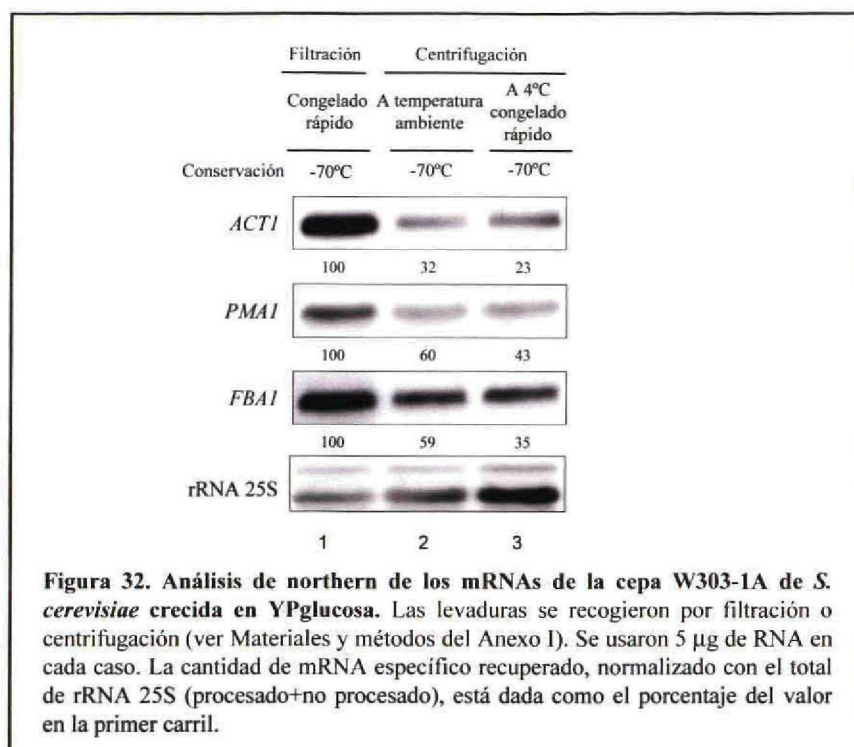


Examinamos si estas diferencias eran dependientes de la cepa de levadura. Como se muestra en la figura 31 el rendimiento del mRNA de *FBP1* fue también de unas 5 veces mayor en RNA extraído de levaduras filtradas de la cepa CEN.PK 102-5B o de la cepa S288c. Curiosamente, en los RNA extraídos de estas cepas la cantidad de rRNA no procesado es muy baja.



En el caso de las levaduras crecidas en glucosa para cuantificar el mRNA recuperado, usamos como sonda la de *ACT1* y la de genes que se expresan bien durante el crecimiento en glucosa, tales como *FBP1* y *PMAL* (que codifican la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa y la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática, respectivamente). También en este caso los mRNAs examinados fueron más abundantes cuando las levaduras se filtraron que cuando se recogieron por centrifugación (fig. 32). Sin embargo, las diferencias no fueron tan marcadas como en el caso de las levaduras desreprimidas (2-4 veces vs. 3-10 veces).



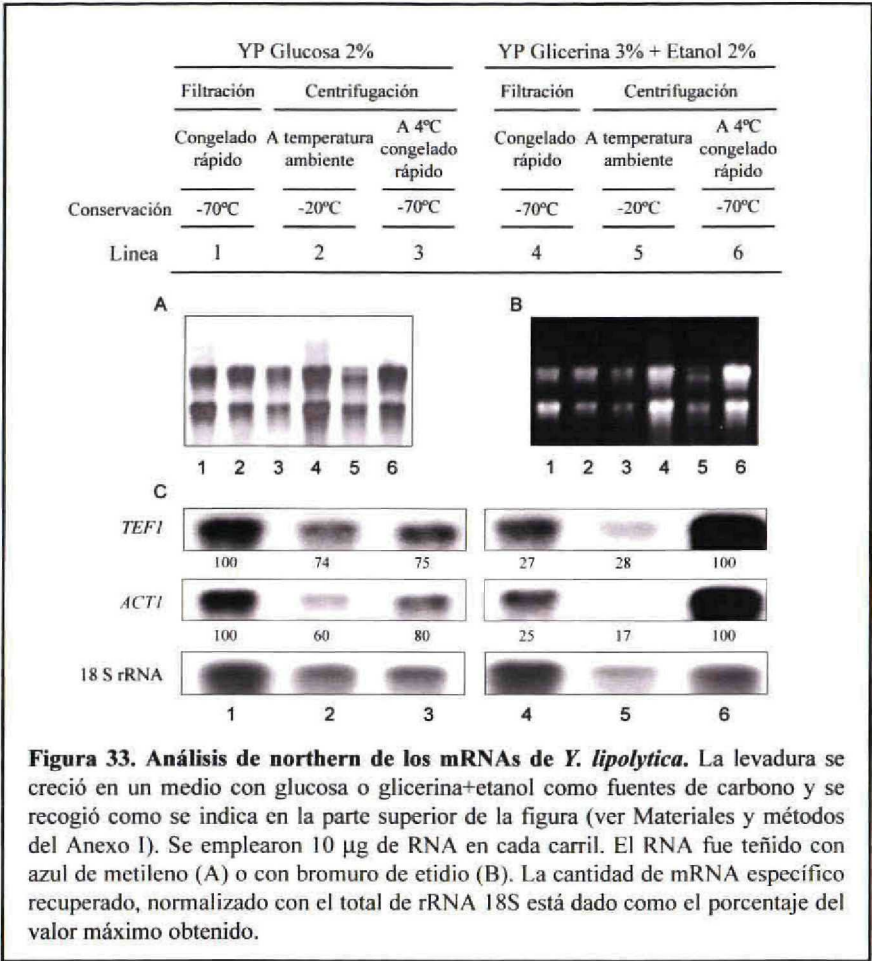


Las diferencias en el mRNA recuperado observadas entre los procedimientos alternativos son reproducibles. Se han realizado al menos 7 análisis de northern con diferentes cepas de *S. cerevisiae* creciendo en distintas condiciones, comparándose levaduras filtradas y centrifugadas, y los rendimientos de mRNA fueron consistentemente más altos en las levaduras filtradas. La razón para estas diferencias no está clara, aunque podría considerarse la hipótesis de que el proceso de centrifugación constituye una situación de estrés para las células. Estudios acerca de la vida media de los mensajeros en células intactas de *S. cerevisiae* dan valores de 60 min para el mRNA de *ACT1* y de 8 min para el mRNA de *FBP1* (Mercado, J. J. *et al.*, 1994) en cultivos a 30°C. Por lo tanto, incluso si asumimos un paro inmediato de la síntesis de mRNA al principio de la centrifugación, sólo una pequeña proporción del mRNA de *ACT1* y no más del 40% del mRNA de *FBP1* podría haber sido degradado en el paso de la centrifugación. Esto sugiere la existencia de otro mecanismo para explicar el diferente comportamiento de los mRNAs. Una posibilidad es que hubiera 2 fracciones de mRNA: una de ellas (mRNA libre?) sería lábil en células estresadas y centrifugadas, pero se preservaría en levaduras filtradas, mientras que la otra (mRNA unido a ribosomas?) sería más estable. El hecho de que el rendimiento de mRNA sea

más sensible para al procedimiento de recogida de muestras en las levaduras desreprimidas que en las crecidas en glucosa sugiere que el tamaño relativo de las dos fracciones de mRNA depende del estado fisiológico de la levadura. Alternativamente (o además), las RNAsas que podrían llevar a cabo una rápida degradación de los mRNAs y los rRNA no procesados 32S o 33S, podrían estar sujetas a represión por glucosa. Puede observarse que en las levaduras recogidas por centrifugación a 4°C, en lugar de a temperatura ambiente, no aumenta la recuperación de mRNAs y podría incluso disminuir el rendimiento. Una vez que las levaduras se han recogido, no hay diferencias entre conservarlas a -20°C o a -70°C, al menos durante un almacenaje a corto plazo.

- Rendimiento de mRNAs en muestras de *Yarrowia lipolytica* recogidas por diferentes procedimientos.

Hemos examinado si el método de recogida de muestras afectaba también a la recuperación de mRNA en especies de levadura relativamente distanciadas, tales como *Yarrowia lipolytica*. Como se muestra en la figura 33, la situación fue diferente en este caso. No fue visible el RNA no procesado en los geles de *Y. lipolytica*. Para las levaduras crecidas en glucosa el rendimiento de dos mRNAs, referidos al rRNA 18S, fue de un 40% mayor en las muestras filtradas. Para las células crecidas en fuentes de carbono gluconeogénicas, los rendimientos mayores se obtuvieron con las células recogidas por centrifugación a 4°C. Parece por tanto que el método óptimo de recogida para *S. cerevisiae* no puede ser directamente transferido a otras especies de levadura y una comparación entre los diferentes métodos debería ser realizada en cada caso.



**Figura 33. Análisis de northern de los mRNAs de *Y. lipolytica*.** La levadura se creció en un medio con glucosa o glicerina+etanol como fuentes de carbono y se recogió como se indica en la parte superior de la figura (ver Materiales y métodos del Anexo I). Se emplearon 10 µg de RNA en cada carril. El RNA fue teñido con azul de metileno (A) o con bromuro de etidio (B). La cantidad de mRNA específico recuperado, normalizado con el total de rRNA 18S está dado como el porcentaje del valor máximo obtenido.

CONCLUSIONES

Hemos desarrollado un procedimiento de toma de muestras de levadura que proporciona un alto rendimiento de mRNA y podría facilitar el uso de sondas con marcaje no radiactivo. Además en determinadas condiciones hemos podido identificar una cantidad significativa de rRNA no procesado. El hecho de que la proporción de mRNA que se pierde durante la centrifugación no sea la misma para levaduras reprimidas por glucosa o desreprimidas tiene implicaciones a la hora de evaluar los resultados publicados sobre expresión diferencial de genes de levadura. Por otra parte si el mRNA para un gen determinado se encontrara en dos fracciones con distinta estabilidad de mRNAs habría que reconsiderar los datos publicados sobre estabilidad de mRNAs que podrían corresponder básicamente a la fracción más estable.



## ***10. ANEXO II. PUBLICACIONES.***

## ANEXO II

Los trabajos que a continuación se indican, y cuya separata, o copia del correspondiente manuscrito, se adjunta en las páginas siguientes, fueron realizados durante el periodo de elaboración de esta Tesis Doctoral.

Derivados de la Tesis

**Belinchón, M. M. y Gancedo, J. M.** (2003). The xylose and some non-sugar carbon sources cause catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **180**(4): 293-297.

**Belinchón, M. M., Flores, C. L. y Gancedo, J. M.** (2004). Sampling *Saccharomyces cerevisiae* cells by rapid filtration improves the yield of mRNAs. *FEMS Yeast Research.* **4**(7): 751-756.

**Belinchón, M. M. y Gancedo, J. M.** (2004). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. En preparación.

Mónica M. Belinchón · Juana M. Gancedo

## Xylose and some non-sugar carbon sources cause catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*

Received: 16 May 2003 / Revised: 11 July 2003 / Accepted: 28 July 2003 / Published online: 30 August 2003  
© Springer-Verlag 2003

**Abstract** Glucose and other sugars, such as galactose or maltose, are able to cause carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Although glycolytic intermediates have been suggested as signal for repression, no evidence for such a control mechanism is available. The establishment of a correlation between levels of intracellular metabolites and the extent of catabolite repression may facilitate the identification of potential signal molecules in the process. To set a framework for such a study, the repression produced by xylose, glycerol and dihydroxyacetone upon genes belonging to different repressible circuits was tested, using an engineered strain of *S. cerevisiae* able to metabolize xylose. Xylose decreased the derepression of various enzymes in the presence of ethanol by at least 10-fold; the corresponding mRNAs were not detected in these conditions. Xylose also impaired the derepression of galactokinase and invertase. Glycerol and dihydroxyacetone decreased 2- to 3-fold the derepression observed in ethanol or galactose but did not affect invertase derepression. For yeast cells grown in media with different carbon sources, no correlation was found between repression of fructose-1,6-bisphosphatase and intracellular levels of glucose 6-phosphate or fructose 1,6-bisphosphate.

**Keywords** Yeast · Catabolite repression · Gluconeogenesis · Fructose-1,6-bisphosphatase · Isocitrate lyase · Glutamate dehydrogenase · Galactokinase · Invertase · Glucose-6-phosphate

### Introduction

Carbon catabolite repression in yeast has been thoroughly studied and many elements participating in this process

have been characterized (Gancedo 1998; Carlson 1999; Johnston 1999; Schüller 2003). Nevertheless, the signal triggering catabolite repression has not been identified, although it has been suggested that changes in the concentration of some intracellular metabolite(s) may be important for the control of expression of genes subject to repression by glucose (Gancedo 1998; Vincent et al. 2001). Yet the changes in the pattern of metabolites of the yeast cell brought about by glucose are so manifold that it is a difficult task to detect potential regulatory metabolite(s).

It is well established that, in addition to glucose and related hexoses, other sugars such as galactose or maltose are able to repress genes involved in the metabolism of other carbon sources (Polakis and Bartley 1965; Schöler and Schüller 1993; Gamo et al. 1994). As a first step towards the goal of establishing a correlation between changes in the concentration of specific metabolites and the extent of catabolite repression, it would be useful to define a set of carbon sources of different types able to exert various degrees of catabolite repression. With this idea, we studied the capacity of xylose, xylitol, glycerol and dihydroxyacetone to repress the expression of a variety of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Since wild-type strains of *S. cerevisiae* are unable to metabolize pentoses, we used an engineered strain able to grow on xylose as carbon source (Eliasson et al. 2000). In this strain, the genes *XYL1* and *XYL2* from *Pichia stipitis* and *XKS1* from *S. cerevisiae* were integrated in the chromosomal *HIS3* locus. *XYL1*, *XYL2* and *XKS1* encoding xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylulokinase, respectively, are under the control of the *PGK1* promoter.

### Materials and methods

#### Strains and growth conditions

The yeast strains used in this study were TMB3001c (*MATa leu2 trp1 ura3 his3::HIS3 XYL1 XYL2 XKS1*; Eliasson et al. 2000) and CEN.PK102-5B (*MATa ura3-52 his3-Δ1 leu2-3,112*; P. Köster, Frankfurt University, Frankfurt). TMB3001c is derived from CEN.PK113-7A, a strain which is not strictly isogenic with CEN.PK102-5B but which has a similar background. Yeasts were

M. M. Belinchón · J. M. Gancedo (✉)  
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols",  
CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain,  
Fax: +34-91-5854401,  
e-mail: jmgedo@iib.uam.es



grown at 30 °C, with shaking, in a rich medium containing 1% yeast extract and 2% peptone (YP). Yeast extract and peptone were supplied by Pronadisa (Spain). Different carbon sources were used, singly or in combination, at 2% final concentration unless indicated otherwise. Growth was monitored by following the increase in the optical density at 660 nm ( $OD_{660}$ ), using a Spectronic 20.

Derepression of the different enzymes was achieved by growing the yeast in YPglucose, collecting it during the exponential phase of growth and treating it as follows: (a) resuspension, at 4 mg (dry wt)/ml, in YPethanol and incubation at 30 °C, with shaking, for 6 h to derepress the gluconeogenic enzymes [fructose-1,6-bisphosphatase (FbPase), isocitrate lyase (ICL), NAD-dependent glutamate dehydrogenase (GlutDH)], (b) resuspension, at 4 mg (dry wt)/ml, in YPgalactose and incubation at 30 °C, with shaking, for 5 h to derepress galactokinase and (c) resuspension, at 0.3 mg (dry wt)/ml, in YP (0.05%) glucose and incubation at 30 °C, with shaking, for 3 h to derepress invertase. The addition of other carbon sources is indicated in each case.

#### Enzymatic assays

Yeast extracts were prepared by shaking with glass beads as described by Blázquez et al. (1993). FbPase, GlutDH, ICL and galactokinase were measured spectrophotometrically as described previously (Dixon and Kornberg 1959; Doherty 1970; Gancedo and Gancedo 1971; Maitra and Lobo 1971). Protein in the extracts was determined using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce), with bovine serum albumin as a standard. Invertase was assayed as described by Goldstein and Lampen (1975), using whole cells and measuring the glucose formed in the reaction with hexokinase and glucose-6P dehydrogenase.

#### Other assays

Xylose was determined with phloroglucinol, using a colorimetric method (Eberts et al. 1979). The reaction was performed in a final volume of 0.52 ml. After completion, 0.2 ml were transferred to a multiwell plate and the  $OD_{554}$  and  $OD_{480}$  were read. The difference  $OD_{554}-OD_{480}$  was used to calculate the amount of xylose present in the samples. Xylitol was determined by an enzymatic method: 50 mM glycylglycine and 25 mM phosphate (pH 8.6) were used as buffer, NAD was added at 4 mM and the reaction was started with 60 milliunits of sorbitol dehydrogenase. The rate of NAD reduction was followed during the first 90 s and standards of 5–25 nmol xylitol were run in parallel.

#### Determination of intracellular metabolites

To measure the concentration of intracellular metabolites, yeast cells were collected by rapid filtration and frozen in liquid nitrogen; metabolites were extracted with perchloric acid under liquid nitrogen (Sáez and Lagunas 1976). Metabolites were measured spectrophotometrically, using basically the procedures described by Bergmeyer (1983).

#### Northern blot analysis

Yeast samples were collected by rapid filtration, frozen in liquid nitrogen and stored at –20 °C until use. Total RNA was extracted as described by Chomczynski and Sacchi (1987), using the Invitrogen TRIzol LS reagent. The Northern blot was performed as described by Zaragoza et al. (2001). We used the following fragments of DNA as probes: an internal 0.82-kb *EcoRV-StuI* fragment for *FBP1* (positions 57–877), a 0.9-kb fragment (positions 603–1,495) for *ICL1* and a 0.74-kb fragment (positions 1,725–2,468) for *GDH2*, the last two obtained by a PCR reaction. As a reference, a probe for the *ACT1* gene was used (1.56-kb *BamHI-HindIII* fragment, from –477 to 1,085).

## Results

The capacity of xylose and other carbon sources to cause catabolite repression was examined under different conditions. First, the yeast was grown on glucose and then the repressed cells were incubated in different derepressing media (see Materials and methods) in the presence of the carbon sources to be tested. Xylose blocked completely the derepression of the gluconeogenic enzymes FbPase and ICL and decreased strongly the derepression of GlutDH (Table 1). The effect of xylose on galactokinase or invertase derepression was weaker, being about 3-fold for galactokinase at either 1% or 5% xylose (Table 2) and around 4-fold for invertase at 5% xylose (Table 3). The very low

**Table 1** Effect of different non-fermentable carbon sources on the derepression of gluconeogenic enzymes. *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001c was grown in YP medium (1% yeast extract, 2% peptone) with glucose and derepressed for 6 h in the presence of the carbon sources indicated, as described in the Materials and methods. Data are averages ( $\pm$ SD) of at least three independent experiments. mU Milli-units of enzyme activity

Derepression medium	FbPase	ICL	GlutDH
	(mU/mg protein)		
2% ethanol	38 $\pm$ 7	114 $\pm$ 25	162 $\pm$ 48
Ethanol + 1% xylose	<2	2	31 $\pm$ 10
Ethanol + 5% xylose	<1	<1	17 $\pm$ 6
Ethanol + 1% xylitol	24 $\pm$ 6	77 $\pm$ 28	133 $\pm$ 18
Ethanol + 0.5% dihydroxyacetone	18 $\pm$ 6	38 $\pm$ 8	93 $\pm$ 45
Ethanol + 3% glycerol	23 $\pm$ 3	66 $\pm$ 23	103 $\pm$ 53

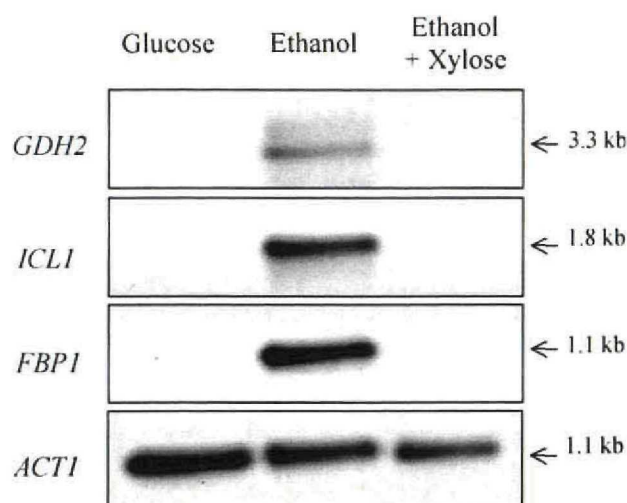
**Table 2** Effect of different non-fermentable carbon sources on the derepression of galactokinase. *S. cerevisiae* TMB3001c was grown in YPglucose and derepressed for 5 h in the presence of the carbon sources indicated, as described in the Materials and methods. Data are averages ( $\pm$ SD) of four independent experiments

Derepression medium	Galactokinase (mU/mg protein)
2% galactose	200 $\pm$ 60
Galactose + 1% xylose	72 $\pm$ 24
Galactose + 5% xylose	60 $\pm$ 15
Galactose + 0.5% dihydroxyacetone	130 $\pm$ 70
Galactose + 3% glycerol	110 $\pm$ 50

**Table 3** Effect of different non-fermentable carbon sources on the derepression of invertase. *S. cerevisiae* TMB3001c was grown in YPglucose and derepressed for 3 h in the presence of the carbon sources indicated, as described in the Materials and methods. Data are averages ( $\pm$ SD) of at least three independent experiments

Derepression medium	Invertase (mU/mg wet wt yeast)
0.05% glucose	340 $\pm$ 40
Glucose + 1% xylose	305 $\pm$ 90
Glucose + 5% xylose	81 $\pm$ 19
Glucose + 0.05% dihydroxyacetone	370 $\pm$ 150
Glucose + 3% glycerol	380 $\pm$ 60





**Fig. 1** Effect of xylose on the mRNA levels of gluconeogenic enzymes. *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001c was grown in YP medium (1% yeast extract, 2% peptone) with glucose and derepressed in the presence of either 2% ethanol or 2% ethanol with 1% xylose, as described in the Materials and methods. Total RNA was extracted from the yeast and mRNA levels measured as described in that section

activity of FbPase, ICL and GlutDH observed in the presence of xylose was associated with undetectable levels of the corresponding mRNAs (Fig. 1).

Repression by xylitol of the gluconeogenic enzymes was limited to 30–40% (Table 1). This is likely related to the fact that xylitol is not efficiently used, even by the TMB3001c strain. In fact, we could not measure any significant disappearance of xylitol from the medium after growth of the yeast in YPxylitol; growth was the same in this medium and in YP without any added carbon source.

Interestingly, in the conditions used, the gluconeogenic carbon sources glycerol and dihydroxyacetone were also able to cause some interference with the derepression observed in the presence of ethanol or galactose, with decreases in enzymatic activity in the range of 30–65% (Tables 1, 2). These carbon sources had no effect on the derepression of invertase (Table 3).

The repression caused by xylose is dependent on its metabolism: xylose added to the derepression medium of

a yeast strain unable to use it did not produce significant effects (Table 4). In contrast, the inhibitory effects of glycerol and dihydroxyacetone were similar in this strain and in strain TMB3001c.

In another approach, the effect of the different carbon sources on catabolite repression was examined during growth of the yeast in media containing a derepressing carbon source, a potentially repressing carbon source, or a mixture of both. The results obtained are shown in Tables 5, 6, 7. For the different enzymes tested, the activities were very similar in glycerol alone, or glycerol with ethanol. For isocitrate lyase, the activity was much lower in these media than that observed during growth on ethanol, the decrease for FbPase was only around 30%

**Table 5** Effect of different non-fermentable carbon sources on the level of gluconeogenic enzymes. *S. cerevisiae* TMB3001c was grown in a rich medium (YP) with the carbon sources indicated and collected during the exponential phase of growth. Data are averages ( $\pm$ SD) of at least three independent experiments

Growth medium	FbPase	ICL	GlutDH
	(mU/mg protein)		
2% glucose	$\leq 2$	$\leq 1$	10 $\pm$ 3
2% ethanol	60 $\pm$ 12	140 $\pm$ 50	160 $\pm$ 30
3% glycerol	40 $\pm$ 6	28 $\pm$ 4	235 $\pm$ 20
2% ethanol + 3% glycerol	41 $\pm$ 11	30 $\pm$ 1	190 $\pm$ 100
1% xylose	20 $\pm$ 5	24 $\pm$ 2	240 $\pm$ 30
2% ethanol + 1% xylose	19 $\pm$ 6	31 $\pm$ 15	85 $\pm$ 25

**Table 6** Effect of different non-fermentable carbon sources on the level of galactokinase. *S. cerevisiae* TMB3001c was grown in a rich medium (YP) with the carbon sources indicated and collected during the exponential phase of growth. Data are averages ( $\pm$ SD) of at least three independent experiments

Growth medium	Galactokinase (mU/mg protein)
2% galactose	520 $\pm$ 120
Galactose + 1% xylose	490 $\pm$ 100
Galactose + 5% xylose	570 $\pm$ 110
Galactose + 0.5% dihydroxyacetone	760 $\pm$ 90
Galactose + 3% glycerol	480 $\pm$ 110

**Table 7** Effect of different non-fermentable carbon sources on the level of invertase. *S. cerevisiae* TMB3001c was grown in a rich medium (YP) with the carbon sources indicated and collected during the exponential phase of growth. Data are averages ( $\pm$ SD) of at least three independent experiments

Growth medium	Invertase (mU/mg wet wt yeast)
2% glucose	6 $\pm$ 5
2% sucrose	19 $\pm$ 1
2% raffinose	240 $\pm$ 20
1% xylose	80 $\pm$ 19
2% sucrose + 1% xylose	29 $\pm$ 19
2% raffinose + 1% xylose	180 $\pm$ 40
2% raffinose + 5% xylose	100 $\pm$ 30

**Table 4** Effect of different non-fermentable carbon sources on the derepression of gluconeogenic enzymes. *S. cerevisiae* CENPK 102-5B was grown in YPglucose and derepressed for 6 h in the presence of the carbon sources indicated, as described in the Materials and methods. Data are averages ( $\pm$ SD) of three independent experiments

Derepression medium	FbPase	ICL	GlutDH
	(mU/mg protein)		
2% ethanol	32 $\pm$ 5	115 $\pm$ 24	128 $\pm$ 14
Ethanol + 1% xylose	25 $\pm$ 4	120 $\pm$ 37	110 $\pm$ 34
Ethanol + 0.5% dihydroxyacetone	19 $\pm$ 5	48 $\pm$ 14	98 $\pm$ 17
Ethanol + 3% glycerol	19 $\pm$ 4	82 $\pm$ 11	107 $\pm$ 6



and the activity for GlutDH could be even higher. Xylose, either alone or together with ethanol, allowed a partial derepression of FbPase and ICL (about 30% and 20% respectively of that observed in ethanol-grown cells). Surprisingly, derepression of GlutDH was as high during growth in xylose as during growth in glycerol while, in a mixture of xylose and ethanol, it was 2- to 3-fold lower than in media with either of these carbon sources.

Neither xylose, at 1% or 5%, nor dihydroxyacetone or glycerol decreased the activity of galactokinase during growth on galactose (Table 6).

To derepress invertase, we grew the yeast on raffinose, since growth on sucrose resulted in very low invertase levels (Table 7). The addition of 1% or 5% xylose caused a reduction in invertase activity (25%, 60%, respectively), while growth on xylose alone allowed partial derepression of invertase.

## Discussion

In the course of this work, we established that a variety of carbon sources are able to repress a diversity of enzymes to different degrees. An intriguing observation is the different effect of the repressing carbon sources during short-term derepression and during growth (cf. Tables 1, 2 vs 5, 6). A possible interpretation is that xylose and other carbon sources have only a transient effect, as happens when cAMP is added to the derepressing medium (Zaragoza et al. 1999). However, this does not appear to be the case, since the gluconeogenic enzymes in cells resuspended in a medium containing ethanol and xylose are still repressed 24 h after resuspension (data not shown). Most likely, the metabolic conditions achieved in derepression conditions, where little growth takes place, are not equivalent to those attained by a growing yeast. A possible difference is that some inhibitory metabolite accumulates during growth on glucose and cannot be degraded effectively in the presence of a carbon source, such as xylose, unless the cells are growing. To test this idea, we starved glucose-grown cells overnight in water, before derepressing them in YPethanol in the presence or absence of 1% xylose. We observed that, even in these conditions, repression by xylose was much stronger than that observed in yeast growing in YPethanol with 1% xylose. A trivial possibility is that xylose is rapidly degraded during growth, but we found, even in conditions where xylose had no strong repressive effect, that most of the xylose added remained present in the medium. Our conclusion is that the pattern of intracellular metabolites varies widely, depending on the carbon sources present and the presence or absence of growth, which in turn affects the rate of transcription of genes subject to catabolite repression.

Xylose enters the pentose phosphate pathway at the level of xylulose 5-P; later the combined action of a pentose phosphate isomerase and an epimerase, together with transaldolase and transketolase, yields fructose 6-P and glyceraldehyde 3-P, two intermediates of the glycolytic pathway. It could be expected that intracellular levels of

**Table 8** Lack of correlation between repression of FbPase and intracellular level of hexose phosphates. *S. cerevisiae* TMB3001c was grown in a rich medium (YP) with the carbon sources indicated. To determine the intracellular level of metabolites, cells were collected at the exponential phase of growth and extracts performed as described in the Materials and methods. The number of independent cultures sampled is given in brackets. Data for FbPase activities are taken from table 5

Growth media	Glucose 6P (mM)	Fructose 1,6P <sub>2</sub> (mM)	FbPase (mU/mg protein)
2% glucose	0.94±0.06 (4)	3.0±0.2 (4)	≤1
1% xylose	0.34±0.01 (2)	<0.1 (2)	20
3% glycerol	0.56±0.06 (2)	0.16±0.06 (2)	40
2% ethanol	0.48±0.07 (5)	0.10±0.06 (5)	60

pentose phosphates and some glycolytic intermediates increase when xylose is present in the medium, but there are no data on this point.

It is noteworthy that the different enzymes tested do not respond in the same way to the presence of repressive carbon sources. This may indicate that the repressing signal is not the same for the different genes. Alternatively, the level of transcription of the genes could depend both on a general repressing signal and on an inducing signal, which may be specific for different sets of genes. Isocitrate lyase, for instance, appears to require 2C carbon sources, such as acetate or ethanol, to be fully induced (Fernández et al. 1993; Table 5).

Regarding the identity of putative repressing elements, several suggestions have been made. It was proposed that the Tps1 protein (trehalose-6P synthase) could play a role in glucose-sensing (Van Aelst et al. 1993), but it was later found that Tps1 is dispensable for the repression of the different genes tested (Rodríguez and Gancedo 1999). Although cAMP plays a role in the repression by glucose of the gene encoding FbPase, it appears to be redundant with other regulatory mechanisms (Zaragoza et al. 1999; Zaragoza and Gancedo 2001). Since glucose 6-P is also a candidate regulatory molecule (Gancedo 1998; Vincent et al. 2001) and there are large changes in the intracellular concentration of fructose 1,6-bisphosphate between glycolytic and gluconeogenic conditions (Gancedo and Gancedo 1973), we compared the intracellular levels of these metabolites in conditions where there is a wide range of FbPase activities. As shown in Table 8, although the concentration of both glucose 6-P and fructose 1,6-bisphosphate is lowest in xylose-grown yeast, FbPase is only partially derepressed in these conditions. We conclude therefore that rather than look at individual "promising" metabolites, it is necessary to set up a system which allow measurement of a large variety of metabolites in extracts from yeasts subject to many different conditions. In this way, it should be possible to look for correlations between metabolites and the extent of repression of individual genes, as a first step for understanding how the signal for catabolite repression is transmitted.

**Acknowledgements** We thank B. Hahn-Hägerdal and P. Kötter for providing yeast strains. We are indebted to Eduardo Silles for



determining the concentration of intracellular metabolites. This work was supported by EU project BIO-HUG QLK3-CT-1999-00080 and by grant BMC2001-1690-CO2-01 from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica. M.M. had a fellowship from the EU and later from the DGICYT.

## References

- Bergmeyer H (1983) Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim
- Blázquez MA, Lagunas R, Gancedo C, Gancedo JM (1993) Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett* 329:51–54
- Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2:202–207
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
- Dixon GH, Kornberg HL (1959) Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem J* 72:3P
- Doherty D (1970) L-Glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods Enzymol* 17A:850–856
- Eberts TJ, Sample RH, Glick MR, Ellis GH (1979) A simplified, colorimetric micromethod for xylose in serum or urine, with phloroglucinol. *Clin Chem* 25:1440–1443
- Eliasson A, Christensson C, Wahlbom CF, Hahn-Hagerdal B (2000) Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol* 66:3381–3386
- Fernández E, Fernández M, Moreno F, Rodicio R (1993) Transcriptional regulation of the isocitrate lyase encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333:238–242
- Gamo FJ, Lafuente MJ, Gancedo C (1994) The mutation *DGT1-1* decreases glucose transport and alleviates carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176:7423–7429
- Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:334–361
- Gancedo JM, Gancedo C (1971) Fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in fermenting and non-fermenting yeasts. *Arch Microbiol* 76:132–138
- Gancedo JM, Gancedo C (1973) Concentration of intermediary metabolites in yeast. *Biochimie* 55:205–211
- Goldstein A, Lampen JO (1975)  $\beta$ -D-Fructofuranoside fructohydrolase from yeast. *Methods Enzymol* 42:504–511
- Johnston M (1999) Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* 15:29–33
- Maitra PK, Lobo Z (1971) A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. *J Biol Chem* 246:475–488
- Polakis E, Bartley W (1965) Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *Biochem J* 97:284–297
- Rodríguez C, Gancedo JM (1999) Glucose signaling in yeast is partially mimicked by galactose and does not require the Tps1 protein. *Mol Cell Biol Res Commun* 1: 52–58
- Sáez MJ, Lagunas R (1976) Determination of intermediary metabolites in yeast. Critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels. *Mol Cell Biochem* 13:73–78
- Schöler A, Schüller H-J (1993) Structure and regulation of the isocitrate lyase gene *ICL1* from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 23:375–381
- Schüller HJ (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 43: 139–160
- Van Aelst L, Hohmann S, Bulaya B, Koning W de, Sierkstra L, Neves MJ, Luyten K, Alijo R, Ramos J, Cocceti P, Martegani E, Magalhaes-Rocha NM de, Brandao RL, Van Dijk P, Vanhalewyn M, Durnez P, Jans AWH, Thevelein JM (1993) Molecular cloning of a gene involved in glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 8:927–943
- Vincent O, Townley R, Kuchin S, Carlson M (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev* 15:1104–1114
- Zaragoza O, Gancedo JM (2001) Elements from the cAMP signaling pathway are involved in the control of expression of the yeast gluconeogenic gene *FBP1*. *FEBS Lett* 506:262–266
- Zaragoza O, Lindley C, Gancedo JM (1999) Cyclic AMP can decrease expression of genes subject to catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181:2640–2642
- Zaragoza O, Vincent O, Gancedo JM (2001) Regulatory elements in the *FBP1* promoter respond differently to glucose-dependent signals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 359:193–201

## Sampling *Saccharomyces cerevisiae* cells by rapid filtration improves the yield of mRNAs

Mónica M. Belinchón, Carmen-Lisset Flores, Juana M. Gancedo \*

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, E-28029 Madrid, Spain

Received 19 November 2003; received in revised form 10 February 2004

First published online 10 March 2004

### Abstract

To optimize the recovery of mRNAs extracted from yeast, different methods for sampling the yeast cells have been compared. For *Saccharomyces cerevisiae* strains growing on gluconeogenic carbon sources (derepressed cells) rapid filtration allowed much higher yields (3–10 fold) than centrifugation at room temperature or at 4 °C. Recovery of total RNA was similar with the different procedures. For *S. cerevisiae* growing on glucose, filtration caused a 2–4 fold improvement on the mRNA yields obtained from cells sampled by centrifugation. It was also observed that, when derepressed cells of *S. cerevisiae* W303-1A were collected by filtration and flash-frozen, part of the 25S and 18S rRNAs (up to 50%) was recovered in an unprocessed 32S or 33S form.

© 2004 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** mRNA yield; 32S rRNA; Northern hybridization; *Saccharomyces cerevisiae*; Yeast sampling

### 1. Introduction

The analysis of changes in gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* as a response to different stimuli, or as a consequence of specific mutations, is an object of interest for a large number of laboratories. A variety of techniques has been developed to perform such studies: standard Northern blots, hybridization arrays [1], kinetic RT-PCR [2], serial analysis of gene expression (SAGE) [3], or differential display [4]. All these procedures have a common first step, the isolation of RNA from the yeast cells, and it is essential that during this process the mRNAs present in the living cells remain, as far as possible, intact.

While methods to extract RNA have been optimized and several suitable techniques are now available [5,6], not much attention has been given to the method utilized for yeast sampling. Usually the yeast cells are collected by centrifugation, but while some protocols

recommend collecting the cells on ice [7], others warn of possible changes in mRNA levels due to cold-shock [8]. A much-quoted procedure [9] does not give any detail on the centrifugation conditions. The method described in the 2003 edition of Current Protocols [6] involves 3 min centrifugation at 4 °C, and it is noted that "the time and speed of the centrifugation are not critical". The Qiagen protocols using RNeasy columns (www1.qiagen.com) advise to collect the yeast cells by 5 min centrifugation at 4 °C and to "loosen the pellet thoroughly by flicking the tube" before suspension in the disrupting buffer. In some cases the yeast cells are even washed with water after the centrifugation step [10,11]. Filtration of yeast cells has been proposed as a possible alternative to centrifugation [8], but apparently the different methods have not been tested in parallel.

Sampling by centrifugation did not seem rapid enough to conduct studies which examine short-term changes in transcription and a quick filtration procedure appeared more suitable. As a prerequisite for such studies, we carried out a detailed comparison of the RNA patterns in extracts from yeast sampled by rapid filtration, or collected by centrifugation in the cold or at

\* Corresponding author. Tel.: +34-91-58544-33;  
fax: +34-91-58544-01.

E-mail address: jmgancedo@iib.uam.es (J.M. Gancedo).



room temperature. We show that yields of mRNA are much higher when yeast cells are collected by rapid filtration and immediately frozen in liquid nitrogen.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains and growth conditions

Yeast strains used were *S. cerevisiae* W303-1A, *MATa ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1* [12], CEN.PK 102-5B, *MATa his3Δ1 leu2-3 112 ura3-5 MAL2-8c SUC2*, provided by P. Kötter (Frankfurt, Germany), and S288c, *MATa SUC2 mal gal2 CUP1* (Yeast Genetic Stock Center, Berkeley CA, USA) and *Yarrowia lipolytica* PO1A, *MATa Δleu2-270 ura3-302*, provided by C. Gaillardin (Thiverval-Grignon, France). The yeast cultures were grown at 30 °C in YP (1% yeast extract, 2% peptone) with 3% glycerol + 2% ethanol (derepressing medium) or with 2% glucose as carbon source.

### 2.2. Sampling of yeast

Different sampling and storage conditions were used. The procedure used in each case is indicated in the corresponding figures. In all cases the yeast cells were collected during the exponential phase of growth ( $OD_{660}$  of 0.6–1).

#### 2.2.1. Rapid filtration

An aliquot of the yeast culture (containing 50–100 mg wet weight yeast) was filtered under vacuum through a nitrocellulose membrane (Millipore AAWP04700) in less than 30 s. The yeast was immediately removed from the filter with a wide plastic spatula and frozen in liquid nitrogen (flash freeze). The frozen yeast was transferred with a cold forceps to a plastic tube and stored at –20 or –70 °C until use (no longer than 48 h). This procedure allows to process several samples in a few minutes.

#### 2.2.2. Centrifugation

The same amount of the yeast culture as above was centrifuged at 700g during 4 min either at 4 °C or at room temperature; after removing the supernatant the cells were either stored at –20 or –70 °C, or frozen in liquid nitrogen (flash freeze) and stored at –70 °C.

### 2.3. RNA extraction

RNA was extracted with phenol, in the presence of guanidine isothiocyanate [5] using the following procedure: 0.8 ml of cold TRIzol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were added to the yeast pellet and the resulting suspension was transferred to a microcentrifuge tube containing 0.5 g of sterile glass beads, 0.5 mm diameter, which had been soaked in concentrated

nitric acid, washed thoroughly with water, and dried overnight in a baking oven at 200 °C. The suspension was shaken for 4 min in a vortex mixer; after 5 min at room temperature, 0.2 ml chloroform/isoamyl alcohol (24:1) were added and the tubes shaken vigorously by hand. After 5 min incubation in ice, the suspension was centrifuged at 7000g for 15 min in the cold. The upper, aqueous phase was transferred to a new tube, 0.5 ml isopropanol was added, the mixture was incubated 10 min in ice and centrifuged at 11,000g for 10 min in the cold. The supernatant was removed and the pellet washed with 1 ml cold 70% ethanol. After vacuum-drying for 5 min, the RNA pellet was dissolved in 50 µl of milli-Q water. RNA was denatured by incubating for 10 min at 65 °C and it was checked that the ratio  $A_{260}/A_{280}$  was around 1.9. Quantitation was carried out taking into account that 40 µg ml<sup>–1</sup> of ssRNA give an  $A_{260}$  of 1.

### 2.4. Northern-blot analysis

The RNA samples were mixed with 3 volumes of loading buffer (20 mM MOPS, pH 7, 8 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 2 M formaldehyde, 12.6 M formamide and 0.04 mg ml<sup>–1</sup> ethidium bromide), heated at 65 °C for 15 min and chilled in ice. The RNAs were separated on 2.2 M formaldehyde/0.8% agarose gel. The gel was washed once with distilled sterile water and twice with 20 × SSC, for 30 min each time. Transfer of the RNAs to a nylon membrane (Nytran N, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) was performed by unidirectional capillarity using 20 × SSC buffer. The RNAs were fixed to the membrane by two cycles of UV light (120 mJ/cm<sup>2</sup>) in a Stratalinker 2400. The membrane was stained with 0.02% methylene blue in 0.3 M sodium acetate, pH 4.3, and then washed with water to visualize the rRNAs. After destaining the membrane with 20 mM NaCl, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0.2 mM EDTA, 1% SDS, hybridization with labelled probes was performed at 65 °C in Church buffer [13].

For *S. cerevisiae* we used as probes a 1.56-kb *Bam*HI–*Hind*III fragment containing the *ACT1* gene, from position –477 to 1085, a 0.82-kb *Eco*RV–*Stu*I fragment of the *FBP1* gene, from position 57 to 877, a 0.9-kb fragment of the *ICL1* gene from position 603 to 1495, a 0.74-kb fragment of the *GDH2* gene from position 1725 to 2468, a 1.23-kb *Bst*XI–*Bst*XI fragment of the *PMAL* gene from position 1036 to 2265, a 0.67-kb *Nco*I–*Nco*I fragment of the *FBA1* gene from position 1162 to 1832. As a control for loading we used the 25 S rRNA which was hybridized with a 1.27-kb probe prepared by PCR with genomic DNA as template, using the primers 5'-AGGTCGTACTGATAACCGCAG-3' and 5'-ATGGT GCTTCGCGGCAATGCC. We also identified 18S rRNA and the L-A dsRNA virus with specific probes: in the first case a 0.91-kb probe prepared from genomic DNA with the primers 5'CCTTAACGAGGAACAATT



GGAGG-3' and 5'-GGCATCACAGACCTGTTATT-3' and in the second a 1.2-kb probe prepared with total RNA as template and the primers 5'-GAGTACAAGCTGTATCGCGTCA-3' and 5'-CACCTTTGCTGCCTCTGCCTGG-3'.

For *Y. lipolytica* we used as probes a 1.07-kb *ScaI*-*XhoI* fragment of the *ACT1* gene [14] and a 1.4-kb fragment of the *TEF1* gene, synthesized by PCR from genomic DNA with the primers 5'-CACTAGGTAC-AAGCAGCTTA-3' and 5'-TAAGAATCATTCAAAA-TGGG-3'. As reference we used the 18S rRNA which was hybridized with a 0.84-kb probe prepared from genomic DNA with the primers 5'-CCTTAACGAGGA-ACAATTGGAGG-3' and 5'-GGCATCACAGACCT-GTTATT-3'.

The probes were labelled with the Rediprime<sup>TM</sup>II random prime labelling system and purified with Nick<sup>TM</sup> columns (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Quantitation of the labelled bands in Northern blots was performed by densitometric scanning in an Instantimager (Packard, Boston, MA, USA).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. RNAs from *S. cerevisiae* sampled by different procedures

*S. cerevisiae* W303-1A growing in a medium with glycerol + ethanol as carbon sources was sampled either by rapid filtration or by a short centrifugation, and stored at  $-20$  or  $-70$  °C. The total amount of RNA extracted from the samples collected by different procedures was very similar (Table 1) and the rRNAs appeared to maintain the same integrity in all samples (Fig. 1A,B). We noticed, however, that in the extracts from filtered cells (lanes 1–2) there was a strong band at

ca. 6 kb, which was very faint in extracts from centrifuged cells (lanes 3–5). In RNA extracted from glucose-grown yeast this band may also be observed (Fig. 1C, D). We considered the possibility that the RNA which runs slower than the 25S rRNA could correspond to the L-A dsRNA virus which has been reported to be present in most laboratory strains [15]. However, hybridization with a probe for this dsRNA gave the strongest signal at a shorter distance from the origin, where no RNA band was visible after staining with methylene blue (Fig. 2A). Since we observed that the slow-running RNA hybridized with a probe for 25S rRNA used as a control for loading (Fig. 2B), we investigated if it could also bind a probe for 18S rRNA. As shown in Fig. 2C it binds this probe, which is specific and does not show any interaction with the 25S rRNA. It would seem therefore that the upper band, prominent in extracts from derepressed yeast cells sampled by filtration, corresponds to partially processed 32S or 33S rRNA (about 6 kb). Apparently, this RNA is less stable in the yeast cells collected by centrifugation.

Table 1

Total RNA yields from *S. cerevisiae* collected by different methods

Sampling method <sup>a</sup>	µg RNA (mg yeast) <sup>-1</sup>
Filtration/flash freeze/storage at $-20$ °C	$1.6 \pm 0.4$ [8]
Filtration/flash freeze/storage at $-70$ °C	$1.4 \pm 0.4$ [5]
Centrifugation at $22$ °C/storage at $-20$ °C	$1.4 \pm 0.6$ [8]
Centrifugation at $22$ °C/storage at $-70$ °C	$1.5 \pm 0.5$ [5]
Centrifugation at $4$ °C/flash freeze/storage at $-70$ °C	$1.4 \pm 0.5$ [5]

<sup>a</sup> RNA was extracted from 50–100 mg wet weight of yeast (*S. cerevisiae* W303-1A, grown in YPglycerol + ethanol), collected and stored as indicated, and quantified as described in Section 2. Number of experiments is shown in brackets.

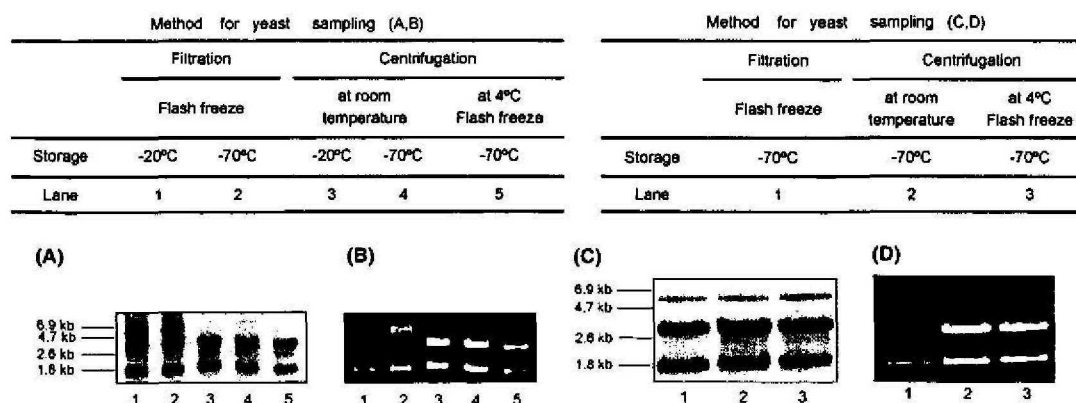


Fig. 1. Pattern of rRNAs extracted from yeast sampled by different methods. *S. cerevisiae* W303-1A growing in YP glycerol + ethanol (A, B) or in YP glucose (C, D) was sampled as indicated in the upper part of the figure (see Section 2 for details). Total RNA was extracted and electrophoresed (5 µg RNA per sample) as described in Section 2. RNA was stained with methylene blue (A, C) or with ethidium bromide (B, D). The positions of RNA size markers are shown on the left.

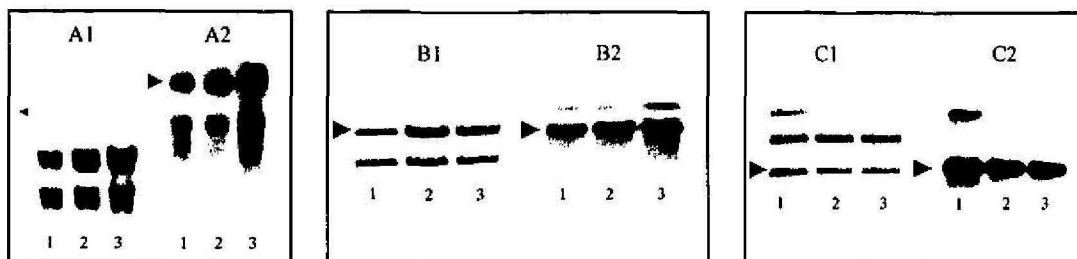


Fig. 2. Northern blot of RNAs from *S. cerevisiae* W303-1A growing in YP glucose and sampled as described in Fig. 1(C, D). In each case 5 µg RNA were used. RNA was stained with methylene blue (A1, B1, C1). Hybridization was performed with labelled probes for L-A dsRNA virus (A2), 25S rRNA (B2) or 18S rRNA (C2); the main band hybridizing with each probe is indicated by an arrow.

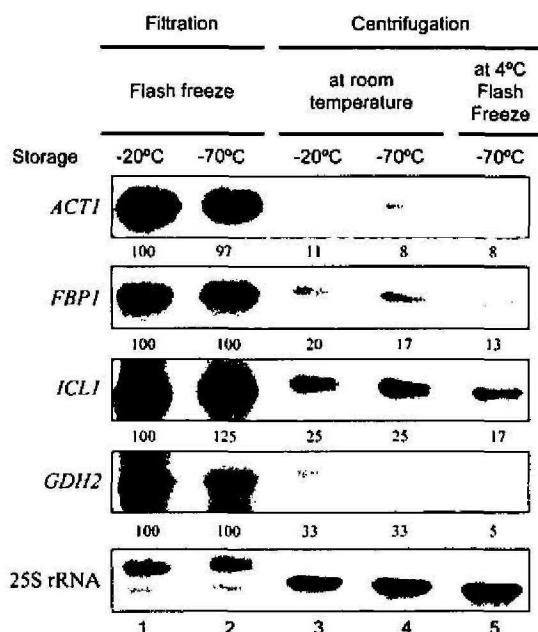


Fig. 3. Northern analysis of mRNAs from *S. cerevisiae* W303-1A growing in YP glycerol + ethanol and sampled by filtration or centrifugation (see Section 2 for details). In each case 5 µg RNA were used. The amount of the recovered specific mRNAs, normalized to total 25S rRNA (processed + unprocessed), is given as the percentage of the value in the first lane.

### 3.2. Effect of the method for sampling *S. cerevisiae* on mRNA yields

To compare the levels of mRNA recovered from de-repressed cells, using different sampling methods, we chose probes of one gene expressed constitutively, *ACT1* (encoding actin), and of several genes strongly repressed by glucose, *FBPI*, *ICL1*, *GDH2*, (encoding fructose-1,6-bisphosphatase, isocitrate lyase, and NAD-dependent glutamate dehydrogenase, respectively). As shown in Fig. 3, in all cases the mRNA yields were much higher (3- to 10-fold) when RNA was extracted from filtered cells.

We checked whether these differences were strain-dependent. As shown in Fig. 4 the yield of *FBPI* mRNA was also about 5-fold higher in RNA extracted from filtered cells of a CEN.PK strain or of strain S288c. On the other hand, there appeared to be very little unprocessed rRNA in the RNA samples extracted from these strains.

For glucose-grown yeast the different procedures yielded also similar levels of rRNAs (Fig. 1C,D). In this case, to measure mRNA recovery, we used as probes *ACT1* and genes well expressed during growth on glucose, such as *FBPI* and *PMA1* (encoding fructose-1,6-bisphosphate aldolase and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, respectively). Also in this case the mRNAs tested were more abundant when the yeast cells were

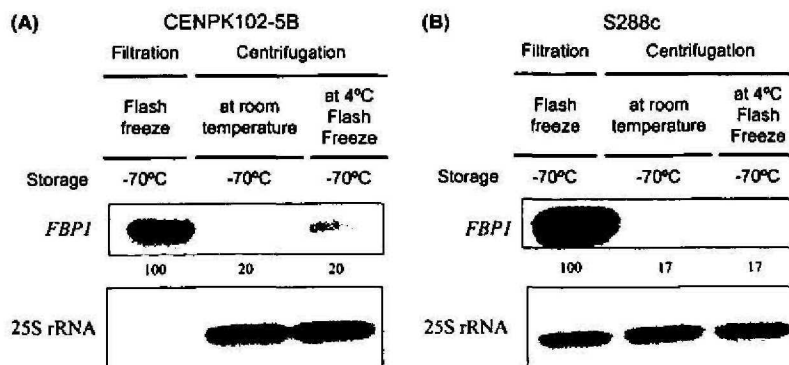


Fig. 4. Northern analysis of mRNAs from *S. cerevisiae* CEN.PK 102-5B (A) and S288c (B) growing in YP glycerol + ethanol and sampled by filtration or centrifugation (see Section 2 for details). In each case 5 µg RNA were used. The amount of the recovered *FBPI* mRNA, normalized to 25S rRNA, is given as the percentage of the value in the first lane.

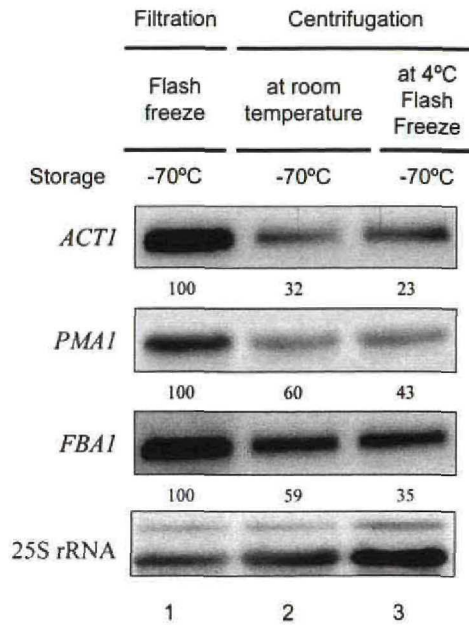


Fig. 5. Northern analysis of mRNAs from *S. cerevisiae* growing in YPglucose and sampled by filtration or centrifugation (see Section 2 for details). In each case 5 µg RNA were used. The amount of the recovered specific mRNAs, normalized to total 25S rRNA (processed + unprocessed), is given as the percentage of the value in the first lane.

filtered than when they were collected by centrifugation (Fig. 5). However, the differences were not as strong as in the case of derepressed cells (2–4 fold vs. 3–10 fold).

The differences in mRNA recovery observed between the alternative procedures are reproducible. At least 7 Northern blots have been performed with different strains of *S. cerevisiae* grown in different conditions, comparing filtered and centrifuged cells, and mRNA yields were consistently higher for the filtered cells. The reasons for the differences in recovery are not clear, although it could be hypothesized that the process of centrifugation places the cells in a stress situation. It has been reported that in intact cells of *S. cerevisiae* at 30 °C the half-life of *ACT1* mRNA is around 60 min [16] and that of *FBA1* mRNA around 8 min [17]. However, even if we assume an immediate arrest of mRNA synthesis at the beginning of the centrifugation, during the centrifugation step itself only a small proportion of the *ACT1* mRNA and no more than 40% of the *FBA1* mRNA should have been degraded. Therefore another mechanism should be at work. A possibility is that there are two pools of mRNA: one of them (free mRNA?) would be labile in the centrifuged, stressed cells, but preserved in the filtered cells, while the other one (mRNA bound to ribosomes?) would be more stable [18]. The fact that

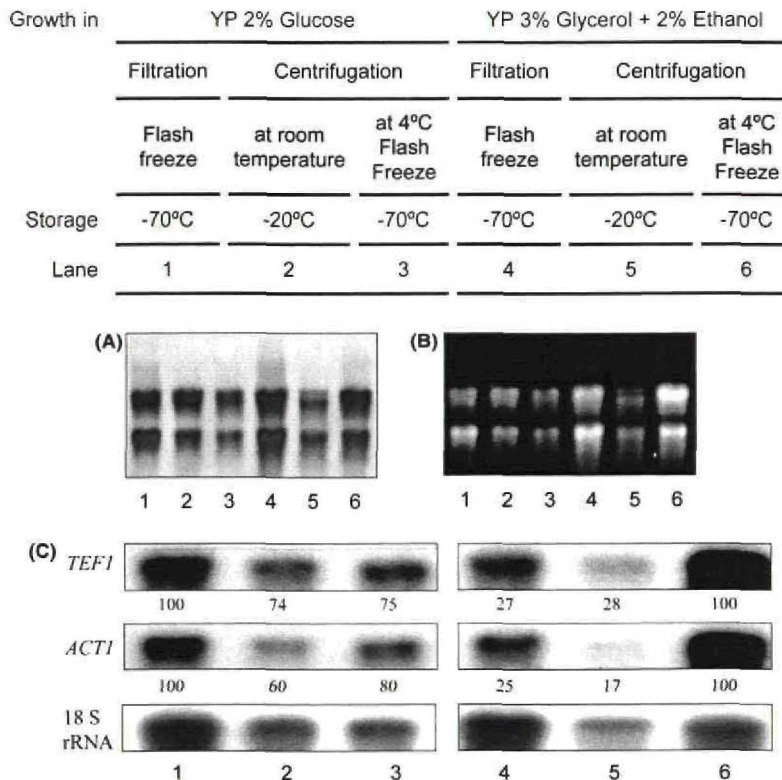


Fig. 6. Northern analysis of mRNAs from *Y. lipolytica*. The yeast was grown in media with glucose or glycerol + ethanol as carbon sources and sampled as indicated in the upper part of the figure (see Section 2 for details). In each case 10 µg RNA were used. RNA was stained with methylene blue (A) or with ethidium bromide (B). The amount of the recovered specific mRNAs, normalized to 18S rRNA, is given as the percentage of the highest yield obtained (C).



yields of mRNA are more sensitive to the sampling procedure in derepressed cells of *S. cerevisiae* than in cells grown on glucose suggests that the relative size of the two pools of mRNA depends on the physiological state of the cells. Alternatively (or, in addition) RNases which carry out rapid degradation of the mRNAs and those processing the 32S or 33S rRNA could be subject to repression by glucose. It can be noted that collecting the cells by centrifugation at 4 °C, instead of at room temperature, does not improve the recovery of mRNAs and may even decrease the yields. Once the yeast has been collected, there is no difference between storing the cells at –20 or –70 °C, at least for short-term storage.

### 3.3. mRNA yields from *Yarrowia lipolytica* collected by different methods

We have examined whether the method of sampling affected also mRNA recovery in a distantly-related yeast species, such as *Y. lipolytica*. As shown in Fig. 6, the situation was different in this case. No unprocessed *Y. lipolytica* rRNA was visible in the gels. For glucose-grown cells the yields of two mRNAs, referred to the 18S rRNA, were about 40% higher in the filtered samples. For cells grown on gluconeogenic carbon sources, the higher yields were obtained with cells collected by centrifugation at 4 °C. It appears therefore that a sampling method optimized for *S. cerevisiae* cannot be directly transferred to other species of yeast and that comparisons between the different methods should be performed in each case.

## 4. Conclusions

We present a procedure that provides high yields of mRNA and could facilitate the use of non-radioactively-labelled probes. The partial loss of mRNA which takes place when *S. cerevisiae* is collected by centrifugation, together with the fact that the proportion lost is different for repressed and derepressed cells, could affect some of the published conclusions on differential expression of yeast genes. In addition, in the light of our results reported data on mRNA stability may have to be reconsidered.

## Acknowledgements

We are indebted to C. Gancedo for critical reading of the manuscript. This work was supported by Grant BMC2001-1690-CO2-01 from the Dirección General de

Investigación Científica y Técnica. M.M.B. was recipient of a fellowship from the DGICYT.

## References

- [1] De Risi, J., Iyer, V. and Brown, O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680–686.
- [2] Kang, J., Watson, R., Fisher, M., Higuchi, R., Gelfand, D. and Holland, M. (2000) Transcription quantitation in total yeast cellular RNA using kinetic PCR. *Nucleic Acids Res.* 28, e2.
- [3] Velculescu, V., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M., Bassett, D.J., Hieter, P., Vogelstein, B. and Kinzler, K. (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 88, 243–251.
- [4] Gross, C. and Watson, K. (1998) Application of mRNA differential display to investigate gene expression in thermotolerant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 431–442.
- [5] Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- [6] Collart, M. and Oliviero, S. (1993) Preparation of yeast RNA. In: *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F., et al. (Eds.)), *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 13.12.1–13.12.5. Wiley, New York.
- [7] ter Linde, J., Liang, H., Davis, R., Steensma, H., van Dijken, J. and Pronk, J. (1999) Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 181, 7409–7413.
- [8] Gash, A. (2002) Yeast genomic expression using DNA microarrays. *Methods Enzymol.* 350, 393–414.
- [9] Lindquist, S. (1981) Regulation of protein synthesis during heat shock. *Nature* 293, 311–314.
- [10] Bolano, A., Stinchi, S., Preziosi, R., Bistoni, F., Allegrucci, M., Baldelli, F., Martini, A. and Cardinali, G. (2001) Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 1, 221–224.
- [11] Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J., Bumgarner, R., Goodlett, D., Aebersold, R. and Hood, L. (2002) Integrated genomic and proteomic analysis of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 292, 929–934.
- [12] Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56, 619–630.
- [13] Church, G. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991–1995.
- [14] Lambert, M., Blanchin-Roland, S., Le Louedec, F., Lepingle, A. and Gaillardin, C. (1997) Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3966–3976.
- [15] Wickner, R. (1996) Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 60, 250–265.
- [16] Santiago, T., Purvis, I., Bettany, A. and Brown, A. (1986) The relationship between mRNA stability and length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 14, 8347–8360.
- [17] Mercado, J.J., Smith, R., Sagliocco, F.A., Brown, A.J.P. and Gancedo, J.M. (1994) The levels of yeast gluconeogenic mRNAs respond to environmental factors. *Eur. J. Biochem.* 224, 473–481.
- [18] Sheth, U. and Parker, R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808.